

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

UNTERSUCHUNGEN ZUR
INTESTINALEN ABSORPTION VON SELENSALZEN
AN ISOLIERTEN BÜRSTENSAUMMEMBRANVESIKELN
VON SCHWEIN, SCHAF UND RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
EDITH ANLIKER-FREI
Tierärztin
von Gondiswil (Kt. Bern)

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Scharrer, Referent
Prof. Dr. H. Jucker, Korreferent

Zürich 1986

Maus Offsetdruck
Konstanz 1986

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

UNTERSUCHUNGEN ZUR
INTESTINALEN ABSORPTION VON SELENSALZEN
AN ISOLIERTEN BÜRSTENSAUMMEMBRANVESIKELN
VON SCHWEIN, SCHAF UND RATTE

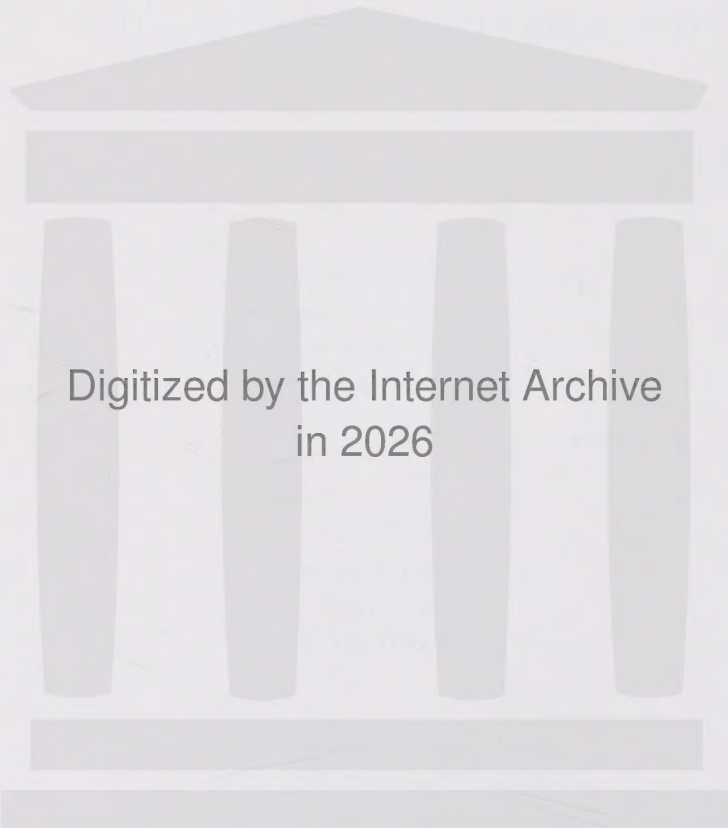
INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
EDITH ANLIKER-FREI
Tierärztin
von Gondiswil (Kt. Bern)

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Scharrer, Referent
Prof. Dr. H. Jucker, Korreferent

Zürich 1986

Maus Offsetdruck
Konstanz 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507227_0009

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURUEBERSICHT	
2.1. Vorkommen von Selen	2
2.2. Toxizität und Kanzerogenität	3
2.3. Selen als essentielles Spurenelement	4
2.4. Intestinale Absorption von Selen	5
2.5. Bioverfügbarkeit von Selen	7
2.6. Stoffwechsel des Selen	8
2.7. Interaktion zwischen Selen und anderen Elementen	9
3. MATERIAL UND METHODEN	
3.1. Tiermaterial	10
3.2. Isolation der Bürstensaummembranvesikel (BSMV)	10
3.3. Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase	11
3.4. Bestimmung des Proteingehalts	12
3.5. Anreicherung der Bürstensaummembran	13
3.6. Versuchsbedingungen und Versuchstechnik	13
3.7. Berechnung der Substrataufnahme in die Vesikel	14
3.8. Statistik	15
4. ERGEBNISSE	
4.1. Funktionsprüfung der BSMV	16
4.2. Na^+ -Abhängigkeit der Aufnahme von Selenat und Selenit in BSMV von verschiedenen Dünndarmabschnitten des Schweines	16
4.3. Na^+ -Abhängigkeit der Selenat- bzw. Selenitaufnahme in BSMV vom Jejunum des Schafes und Ileum der Ratte	21
4.4. Bindung von Selenat bzw. Selenit an die BSMV	21
4.5. Einfluss von Thiosulfat auf die Selenataufnahme in jejunale BSMV vom Schwein	26

4.6. Einfluss von Selenat auf die Sulfataufnahme	26
4.7. Einfluss von D-Glukose bzw. L-Alanin auf die Selenataufnahme in BSMV vom Schwein	28
4.8. Na^+ -unabhängige Selenataufnahme	28
4.9. Potentialabhängigkeit der Selenataufnahme in BSMV vom Schwein	31
5. DISKUSSION	36
6. ZUSAMMENFASSUNG , SUMMARY	40
7. LITERATURVERZEICHNIS	44
8. ANHANG	

1. EINLEITUNG

Verschiedene Krankheiten unserer Nutztiere werden auf einen Selen-/Vitamin E-Mangel zurückgeführt, wie beispielsweise Hepatosis dietetica, Ulcus oesophagogastricum und Maulbeerherzkrankheit beim Schwein sowie Weissmuskelerkrankung, Kümern und Fertilitätsstörungen beim Schaf. Die Beimischung von anorganischen Selensalzen (Selenat, Selenit) zum Mischfutter hat sich als kostengünstige und effektive Methode zur Vorbeugung und Behandlung von Selenmangelzuständen bewährt. Da über die intestinale Absorption von Selenat und Selenit nur wenige Untersuchungen vorliegen, war es das Ziel dieser Arbeit, die Mechanismen der intestinalen Absorption von Selenat und Selenit näher zu charakterisieren.

Die Versuche wurden mit isolierten intestinalen Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) durchgeführt, die die Untersuchung des Substrattransports unabhängig von intrazellulärer Metabolisierung und Beeinflussung durch Transportvorgänge an den basolateralen Membranabschnitten des Darmepithels ermöglichen. Insbesondere können in Experimenten mit BSMV die Milieubedingungen auf beiden Seiten der Membran kontrolliert werden, so dass z.B. der Einfluss transmembranaler Ionengradienten auf den transmembranalen Transport von Substraten untersucht werden kann.

Die BSMV wurden aus verschiedenen Dünndarmabschnitten des Schweines isoliert. Zum Vergleich wurden für einige Experimente auch aus dem Ratten- und Schafdünndarm isolierte BSMV verwendet.

2. LITERATURUEBERSICHT

1818 entdeckte der schwedische Forscher Berzelius ein neues Element. Er benannte das Element nach der griechischen Göttin des Mondes, Selene(12).

Das erste Interesse, das dem Selen (Se) aus biologischer Sicht entgegengebracht wurde, galt seiner Toxizität sowie seiner krebserzeugenden Eigenschaft. Erst 1957 wurde die Bedeutung des Selens als essentielles Spurenelement erkannt. Die kanzerogene Eigenschaft von Se wurde nicht nur widerlegt, im Gegenteil, neuere Forschungen weisen sogar auf antikanzerogene Eigenschaften dieses Elementes hin.

2.1. VORKOMMEN VON SELEN

Selen kommt in allen pflanzlichen und tierischen Geweben vor, wobei die Konzentration je nach Gewebe und Versorgungsstatus beträchtlich schwankt (57). Im Boden kommt Se vor allem in Form von Selensalzen und von elementarem Se vor. Die Konzentration von Se im Boden schwankt von weniger als 0.1 ppm in selenarmen Regionen bis zu Konzentrationen von über 1200 ppm in selenreichen Gebieten (34). In den für die Tierfütterung wichtigen Pflanzen kommt Se überwiegend in Verbindung mit Proteinen vor, vorzugsweise als Selenomethionin (56). Pflanzen auf alkalischen und sauerstoffreichen Böden können weit mehr Se aufnehmen, da hier das Se leicht zu Selenit und Selenat oxidiert wird, während das Se in sauren und sauerstoffarmen Böden meist in Form von elementarem Se oder Seleniden vorkommt und deshalb nur wenig verfügbar ist (34).

Tiere jedoch können Se sowohl als anorganische Selenverbindungen (Selenat und Selenit), als auch in organischer Form verwerten (58). In Selenmangelgebieten erfolgt die Supplementierung des Futters über Selenit, da dies leicht erhältlich ist (58).

2.2. TOXIZITÄT UND KANZEROGENITÄT

Die Toxizität von Selen war schon über 25 Jahre früher bekannt als seine Funktion als essentielles Spurenelement.

Die Symptome einer akuten und chronischen Se-Vergiftung wurden erstmals 1934 in Nordamerika von Franke in selenreichen Regionen bei Weiderindern entdeckt (16). Die akute Form, "blind staggers", ist gekennzeichnet durch zentralnervöse Störungen, die chronische Form, "alkali disease", durch Vitalitätsverlust, Gewichtsverlust, struppiges Fell, Haarausfall, Leberzirrhose, Anämie sowie schmerzhaft und sich ablösende Hufe bzw. Klauen (57).

Das Vorkommen von sogenannten "konvertierenden" Pflanzen spielt dabei eine wichtige Rolle: diese Pflanzen haben die Fähigkeit, das Selen aufzunehmen, welches für andere Pflanzen fast nicht nutzbar ist. Sterben diese Pflanzen ab und gelangen wieder in die Erde zurück, so liefern sie umgewandeltes, nun auch für andere Pflanzen verwertbares Se (57). Akkumulierende Pflanzen wie z.B. Astragalus können, auf Trockensubstanz bezogen, bis zu mehreren Tausend ppm Se enthalten (12,57).

1943 fanden Nelson et al. bei 11 von 53 Ratten, die mit selenreichem Futter 18-24 Monate gefüttert wurden, ein Adenom bzw. ein geringgradiges Karzinom in den zirrhotischen Lebern. Die Kontrollratten zeigten in weniger als 1% spontane Lebertumore (44). Diese Studien jedoch waren fraglich und wurden 1967 im grossangelegten Versuch von Tinsley et al.(53) sowie Harr et al.(21) widerlegt. Neuere Studien in der Humanmedizin legen sogar nahe, dass eine niedere Se-Versorgung in Relation zu einem häufigeren Krebsvorkommen steht (36). Schrauzer (50) weist darauf hin, dass eine niedere Selenaufnahme selbst keinen Krebs verursacht, aber die Empfindlichkeit für Krebs, hervorgerufen durch endogene oder exogene Faktoren, erhöht. Diese Resultate weisen demnach eher auf eine antikanzerogene Wirkung von Se hin. Mehrere Langzeitstudien sind im Gange, welche den Wert des Se bei der Krebsprophylaxe abklären sollen. Versuche jedoch, Krebs mit Se zu therapieren, sind bisher fehlgeschlagen (50).

2.3. SELEN ALS ESSENTIELLES SPURENELEMENT

1957 wurde das Se erstmals von Schwartz und Foltz als essentielles Spurenelement erkannt. Sie konnten durch Se-Zufütterung Lebernekrosen bei Ratten verhindern (51). Noch im selben Jahr entdeckten Patterson et al.(45), dass die beim Küken durch Vitamin E-Mangel hervorgerufene exsudative Diathese durch Se-Zugaben zum Futter verhindert werden kann. 1958 beschrieben Muth et al.(42) und Hogue et al. (26) den Effekt von Se und Vitamin E auf die Weissmuskelkrankheit. Sie stellten fest, dass Lämmer von Mutterschafen, die selensupplementiertes Futter erhielten, nicht an Weissmuskelkrankheit erkrankten. Van Vleet hat die bisher mit Vitamin E/Se-Mangel in Zusammenhang gebrachten Krankheitsbilder zusammengefasst (58). Als eindeutig gesicherte Selenmangelkrankheit kann bis heute beim Wiederkäuer einzig die Weissmuskelkrankheit (WMD) angesehen werden. Beim Schwein werden Hepatositis dietetica, Skelettmuskeldegeneration, Maulbeerherzkrankheit und Ulcus oesophagogastricum als klinische Manifestationen eines Vitamin E/Se-Mangels betrachtet. Hanimann und Wallimann (20) konnten allerdings in ihren Wachstumsversuchen und Felderhebungen keinen primären Zusammenhang zwischen Vitamin E/Se-Mangel und Maulbeerherzkrankheit finden. Ein Se-Mangel beim Einzeltier, beruhend auf einem unterschiedlichen Bedarf, ist aber nicht auszuschliessen.

Während einer Studie über drei Jahre in einer Herde von 400 Hochleistungskühen fanden israelische Forscher, dass die einmalige, intramuskuläre Applikation von Selenit drei Wochen vor dem Kalbeterrmin die Häufigkeit von Retentio secundarium auf die Hälfte reduziert. Niedrere Selenitdosen (2.3 - 4.6 mg) zeigten dabei eine bessere Wirkung als höhere (13).

Bereits 1920 wurde das Vitamin E entdeckt. Demgegenüber wurde Se erst 1957 als essentielles Spurenelement erkannt. Doch erst als Rotruck et al.(48) und Flohe et al.(15) 1973 nachweisen konnten, dass Se ein integraler Bestandteil des Enzyms Glutathionperoxidase ist, konnten die Zusammenhänge zwischen Se, Vitamin E und ungesättigten Fettsäuren erklärt werden. Die Se-haltige Glutathion-

peroxidase (Se-GSH-Px) enthält pro Mol vier Grammatome Se (15). Sie katalysiert unter anderem die Reduktion von organischen Peroxiden, welche zum Beispiel aus ungesättigten Fettsäuren entstehen (33). Peroxide können biologische Membranen innert kürzester Zeit zerstören, was zum Zelltod führt. Vitamin E als biologisches Antioxidans verhindert die Bildung von Lipidperoxiden aus Membranphospholipiden (25).

Ein niederer Selengehalt im Blut ist positiv korreliert mit einer Abnahme der Se-GSH-Px-Aktivität, weshalb die Bestimmung der Se-GSH-Px-Aktivität oftmals einen Anhaltspunkt bei einem Selenmangelzustand gibt (25). Neben der Se-GSH-Px konnten bisher andere selenhaltige Enzyme erst bei Bakterien entdeckt werden (3,54). Zusätzlich wurde eine Glutathionperoxidase nachgewiesen, die selenunabhängig ist (31). Die amerikanische Food and Drug Administration erlaubt einen Selenit- oder Selenatzusatz im Futter von maximal 0.3 ppm (bezogen auf Trockensubstanz des Futters). Die toxische Dosis hängt von verschiedenen Faktoren ab und wird mit 4-5 ppm (Trockensubstanz des Futters) angegeben (19). In der Schweiz beträgt die empfohlene Selenmenge im Futter für Rinder 0.1 ppm und für Schweine 0.15 ppm.

2.4. INTESTINALE ABSORPTION VON SELEN

Angeichts der Bedeutung, die dem Se als essentielles Spurenelement und auf Grund seiner Toxizität zukommt, sind Kenntnisse über den Mechanismus der Absorption dieses Elements aus dem Verdauungstrakt von einiger Bedeutung.

Die intestinale Absorption von Se nach oraler Verabreichung von Selenit und Selenat ist beim Schwein höher als beim Schaf (63). Beim Wiederkäuer wird das aufgenommene Se im Pansen teilweise zu unlöslichen und damit schlecht verwertbaren Selenverbindungen reduziert, teilweise von den Pansenbakterien in Selenoamino Säuren eingebaut, die dann als mikrobielles Protein dem Wiederkäuer wieder zur Verfügung stehen (23,63).

Mc Connell und Cho (39) untersuchten 1965 den Mechanismus der Selenit- und Selenocystinabsorption aus dem Dünndarm. Sie konnten dabei an umgestülpten Dünndarmsäckchen von Hamstern keinen Transport gegen einen Konzentrationsgradienten nachweisen und schlossen daraus, dass Selenit und Selenocystin durch einfache Diffusion resorbiert werden. Hingegen fanden sie für Selenomethionin einen transmuralen Transport gegen einen Konzentrationsgradienten, der durch L-Methionin gehemmt werden konnte. Whanger et al.(59) untersuchten die Selenabsorption in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes der Ratte. Weder Selenit noch Selenomethionin wurden im Magen absorbiert. Die höchste mucosale Aufnahme erfolgte für beide Verbindungen im Duodenum. Im Jejunum und Ileum waren die betreffenden Werte etwas niedriger. Wolfram et al.(62) fanden am in vivo perfundierten Rattendarm, dass Selenat aus dem Ileum schneller absorbiert wird als aus dem proximalen Jejunum, Caecum und Colon. Der transepitheliale Transport von Selenat erfolgte zudem in den in vitro-Versuchen von Ardüser et al.(4) nur im Ileum gegen einen Konzentrationsgradienten. Die Selenat-Absorption war dabei von der Aktivität der Na-K-Pumpe abhängig und konnte deshalb mit anderen Nährstoffen, deren intestinaler Transport ebenfalls Na^+ -abhängig ist, gehemmt werden (4). Selenit wurde hingegen nicht gegen einen Konzentrationsgradienten absorbiert und auch eine im Vergleich zu Selenat 1000-fach höhere Selenitkonzentration zeigte keinen Einfluss auf die Selenatabsorption (4). Die Autoren folgerten daraus, dass Selenat mittels eines aktiven Transports von der Dünndarmmucosa absorbiert wird, der keine oder nur eine sehr geringe Affinität zu Selenit aufweist. In neueren Versuchen zeigte sich eine Na^+ -Abhängigkeit der Selenataufnahme in das Epithel des gesamten Dünndarms der Ratte sowie im Jejunum und Ileum des Schafes (5).

2.5. BIOVERFÜGBARKEIT VON SELEN

1975 wurde von Cantor et al. die biologische Verfügbarkeit von verschiedenen Selenverbindungen untersucht, wobei die Verhütung der exsudativen Diathese beim Küken als Mass für die Bioverfügbarkeit diente. Die Forscher fanden für Selenit die höchste Bioverfügbarkeit, gefolgt von Selenat, DL-Selenocystin, Na-Selenid, DL-Selenomethionin und elementarem Se. In späteren Versuchen wurde die Bestimmung der Se-GSH-Px als Mass für die Bioverfügbarkeit angewendet, wobei sich ähnliche Verhältnisse ergaben (7). Neuere Untersuchungen am Truthahnküken ergaben höchste Plasma-Se-Konzentrationen bei einer Zufütterung von Selenat, während die höchsten Werte im Vollblut und in den Erythrocyten nach einer Zufütterung von Selenomethionin erreicht wurden. Truthahnküken, deren Futter Selenat enthielt, zeigten zudem signifikant höhere Se-Konzentrationen und Se-GSH-Px-Aktivitäten im Vollblut und im Plasma gegenüber Küken, deren Futter Selenit enthielt (8).

Die Zulage von 0.1 ppm über Menhadenfischmehl zum Futter von Truthahnküken ergab eine wesentlich geringere Se-GSH-Px-Aktivität als bei Vergleichstieren, die 0.1 ppm Se in Form von Selenit über das Futter verabreicht bekamen (8).

Obwohl Laktovegetarier über die Nahrung mehr Se aufnehmen als die durchschnittliche Bevölkerung, konnte bei 23 Probanden ein signifikant niedrigerer Plasma-Se-Spiegel sowie eine signifikant niedrigere Se-Ausscheidung über den Harn gemessen werden (2).

Luo et al. fanden in einer Studie an Menschen in Selenmangelgebieten in China, dass die Supplementierung der Nahrung mit Selenomethionin zwar höhere Selenwerte im Blut ergab als die Supplementierung mit Selenit, dass sich jedoch kein Unterschied im Anstieg der GSH-Px-Aktivität nach Zugabe von Selenomethionin bzw. Selenit ergab.

Selen in Form von Selenit gelangt zwar bei Mutterschafen nach enteraler bzw. intravenöser Verabreichung schneller und in grösserer Menge in die Milch als Selenomethionin, letzteres weist jedoch für das Lamm eine höhere Bioverfügbarkeit auf (17,28).

2.6. STOFFWECHSEL DES SELENS

Die Kenntnisse über den Selenstoffwechsel sind noch lückenhaft. Das absorbierte Se wird überwiegend in proteingebundener Form transportiert. Die Bestimmung des Se-Gehalts in Blut oder Geweben ist hilfreich zur Diagnose von Selenmangelzuständen, wobei Blutselenkonzentrationen unter $0.05 \mu\text{g/ml}$ im allgemeinen auf einen Selenmangel-Zustand hindeuten (58). Die höchsten Konzentrationen von Selen finden sich in Leber und Niere, die niedrigsten dagegen im Fettgewebe (58).

Ähnlich wie bei Pflanzen (52) und bei Bakterien (52,55) besteht auch beim Tier eine Interaktion zwischen Se und Schwefel (18,32,43,60). Aufgrund der sehr ähnlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften beschreiten Se und Schwefel teilweise gleiche Stoffwechselwege und konkurrenzieren sich gegenseitig (38).

Trimethylselenonium wurde als ein Ausscheidungsprodukt von Selenit, Selenat, Selenomethionin und Selenocystin gefunden. Wird dieses Trimethylselenonium in radioaktiv markierter Form an Ratten verabreicht, so wird es sehr schnell und unverändert mit dem Urin wieder ausgeschieden (7, 57). Der wichtigste Ausscheidungsweg ist dabei die Niere. Bis zu 50% einer per os oder parenteral in Form von Selenit verabreichten Selendosis wurde innerhalb einiger Tage mit dem Urin wieder ausgeschieden (6). Bei Verabreichung von Selen als Selenat scheint die Ausscheidung über die Nieren noch grösser zu sein. Bei sehr hohen Selendosen kann Se teilweise in Form von flüchtigem Dimethylselenid über die Lunge eliminiert werden. Die Ausscheidung von Se über den Kot beträgt etwa 10% des aufgenommenen Se (7).

Beim Wiederkäuer können Pansenbakterien mit dem Futter aufgenommenes anorganisches Se zu organischen Formen metabolisieren, welche in Bakterienprotein eingebaut werden (22).

Die Hauptausscheidung des aufgenommenen Se erfolgt beim Wiederkäuer über den Kot (46,57). Bei hohem Selengehalt des Futters können auch beim Wiederkäuer beträchtliche Mengen von Selen im Urin und in der Milch gefunden werden (14).

2.7. INTERAKTION ZWISCHEN SELEN UND ANDEREN ELEMENTEN

Ueber die Interaktionen zwischen Se und anderen Spurenelementen bzw. Mengenelementen ist wenig bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass gewisse Elemente wie Hg, As, Cd und Cu die Toxizität von Se vermindern und dass umgekehrt Vergiftungen mit Hg, Cd, Co oder Pb durch Se/Vitamin E-Gaben gemildert werden können (24).

Experimente von Cardin und Mason (9) an umgestülpten Ileumsäcken von Ratten ergaben, dass die Anionen Selenat, Wolframat und Molybdat den Sulfattransport hemmen. Ardüser et al.(4) konnten zeigen, dass der Na^+ -abhängige intestinale Selenattransport durch Sulfat stark gehemmt wird. Mit Thiosulfat, das eine sehr hohe Affinität zum "Sulfat-Carrier" besitzt (9), konnte der Selenattransport ebenfalls stark gehemmt werden (5).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. TIERMATERIAL

Für die Isolierung der intestinalen BSMV vom Schwein wurden Dünndärme verwendet, die am Schlachthof der Stadt Zürich ca. 20 min nach der Tötung der Tiere entnommen wurden. Die Darmabschnitte wurden sofort aufgeschnitten und der Darminhalt sorgfältig mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung abgespült. Der Transport zum Institut (20 min) erfolgte ebenfalls in eisgekühlter NaCl-Lösung (0.9%). Für einige Versuche wurde der Dünndarm von Schafen verwendet (5 Tiere, 3-4 Monate alt, Durchschnittsgewicht: 25 kg). Den Tieren wurden unter Narkose (Xylazinhydrochlorid, Bayer, Leverkusen, BRD, 2-7 mg/kg KGW, i.m., und Ketamin-Hydrochlorid, Parke-Davis, München, BRD, 1-3 mg/kg KGW, i.m.) etwa 3m des mittleren Jejunums zur Weiterverarbeitung entnommen.

Für die Versuche mit BSMV von der Ratte wurde das Ileum von acht adulten Tieren für eine Isolation verwendet.

3.2. ISOLATION DER BUESTENSAUMMEMBRANVESIKEL (BSMV)

Die Isolation der BSMV erfolgte nach der modifizierten Methode von Christiansen und Carlsen (10). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Mucosa wurde mit einem Objektträger abgeschabt und 40 ml des Mucosa-Materials mit 200 ml Puffer I (Zusammensetzung, mmol/l: 50 D-Mannit, 2 Tris¹⁾, mit HCl auf pH 7.0 eingestellt) in einem Waring-Blendor (Waring Products Division, New Hartford, USA) 3 min bei Höchstgeschwindigkeit homogenisiert. Eine Probe von 1 ml dieses Mucosahomogenates wurde zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) und des Proteingehalts sofort bei -20°C eingefroren. Dem Homogenat wurde $MgCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mmol/l zugesetzt. Das Homogenat wurde anschliessend 20 min stehengelassen. Danach wurde das Homoge-

1) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

nat in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments AG, Horgen, CH) bei 3000 x g für 15 min zentrifugiert. Der dabei erhaltene Ueberstand wurde anschliessend bei 27'000 x g für 30 min zentrifugiert. Anschliessend wurde das bei der letztgenannten Zentrifugation gewonnene Pellet in 50 ml des Puffers II (Zusammensetzung, mmol/l: 50 D-Mannit, 10 HEPES¹⁾, mit Tris auf pH 7.4 eingestellt) suspendiert. Die Suspension wurde sodann mit einem Glas-Teflon-Homogenisator (Brown Melsungen AG, BRD) bei 1000 Umdrehungen/min mit 8 Hben homogenisiert. Anschliessend erfolgte eine zweite 15-minütige Ausfllung mit MgCl₂ (Mg-Endkonzentration: 10 mmol/l). Danach wurden die Zentrifugationen bei 3000 x g und 27'000 x g wiederholt. Das zuletzt erhaltene Pellet wurde mit 25 ml BSM-Puffer (Zusammensetzung mmol/l: 300 D-Mannit, 20 HEPES, mit Tris auf pH 7.4 eingestellt) mit 8 Hben bei 1000 Umdrehungen/min homogenisiert. In einigen Experimenten wurde ein anderer BSM-Puffer verwendet, dessen Zusammensetzung bei den entsprechenden Versuchen genau beschrieben ist. Danach erfolgte die letzte Zentrifugation für die Dauer von 30 min bei 27'000 x g. Das gewonnene Pellet, in dem die BSMV angereichert sind, wurde mit 1-3ml BSM-Puffer bei 1000 Umdrehungen/min und mit 30 Hben homogenisiert. Für die genaue Bestimmung des Proteingehalts und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde sofort eine Probe von 0.5 ml bei -20⁰ C tiefgefroren. Die gewonnene BSMV-Suspension wurde anschliessend in Portionen zu 420 µl in Cryotubes (GIBCO, Basel, CH) abgefüllt und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

3.3. BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE (AP)

Das überwiegend in der Bürstensaummembran der intestinalen Epithelzellen lokalisierte Enzym alkalische Phosphatase (47) diente zur Beurteilung der Reinheit der isolierten BSMV. Die Bestimmung der Aktivität der AP erfolgte mit einem käuflichen Test (Boehringer, Mannheim, BRD, Nr.415 278).

1) N-2-Hydroxythylpiperazin-N'-2-than-sulfonsäure

Testprinzip:

p-Nitrophenylphosphat + H₂O wird durch die AP in p-Nitrophenol + Phosphat gespalten. Dabei ist die pro Zeiteinheit freigesetzte p-Nitrophenolmenge proportional der AP-Aktivität und kann auf Grund der gelben Farbe von p-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden.

Die Homogenatprobe wurde dazu im Verhältnis 1:25 mit aqua bidest. verdünnt, die BSMV-Probe im Verhältnis 1:500. Zu 0.05 ml verdünnter Probe wurden 3 ml Reagens zugeführt und die Extinktionszunahme pro min ermittelt. Die Aktivität wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Einheiten/l (25}^{\circ}\text{C)} = 3300 \times \text{Verdünnung} \times E_{405 \text{ nm}} / \text{min}$$

(Definition der Einheit: Eine Einheit ist die Enzymaktivität, die ein μmol Substrat (p-Nitrophenyl-phosphat) pro min umsetzt.)

3.4. BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS

Der Proteingehalt von Homogenat und BSM-Suspension wurde mit der BIO-Rad-Methode ermittelt (BIO-Rad-Laboratories, Glattdbrugg, CH, Nr.500-0006). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm zu 595 nm wechselt, wenn dieser Stoff an Protein gebunden wird. Als Standard diene lyophilisiertes Rinder Serum-albumin. Das konzentrierte Reagens wurde mit aqua bidest. 1:5 verdünnt und durch einen Whatmannfilter Nr.1 filtriert. Die Homogenat- und BSM-Proben wurden zur Bestimmung des Proteingehalts mit aqua bidest. 1:30 verdünnt. Zu 0.1 ml verdünnter Probe wurden 5 ml verdünntes Reagens zugeführt. Nach guter Durchmischung wurden die Proben mindestens 5 min stehen gelassen. Die Bestimmung erfolgte anschliessend bei 578 nm Wellenlänge gegen einen Nullwert (0.1 ml aqua bidest. + 5 ml Reagens). Bei jeder Messung wurde ein in gleicher Weise wie die Proben verdünnter Standard mit 12 mg/ml Protein mitbestimmt, der als Bezugsgrösse diente. Die Berechnung des Proteingehalts erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\text{Proteingehalt (mg/ml)} = \frac{\text{Extinktion Probe} \times 12}{\text{Extinktion Standard}}$$

3.5. ANREICHERUNG DER BUESTENSAUMMEMBRAN

Da die AP Überwiegend in der BSM der intestinalen Epithelzellen lokalisiert ist (47), kann dieses Enzym als Marker-Enzym für die BSM verwendet werden. Die Anreicherung der AP-Aktivität in der BSMV-Fraktion gegenüber dem Ausgangsmaterial kann somit als Mass für die Reinheit der intestinalen BSM herangezogen werden. Die Anreicherung berechnet sich aus dem Verhältnis der spezifischen AP-Aktivität (U/mg Protein) in der BSM-Fraktion und der spezifischen Aktivität im Mucosa-Homogenat. In den von uns durchgeführten Isolationen erzielten wir eine 12-18-fache Anreicherung der AP-Aktivität in der BSM-Fraktion verglichen mit dem Ausgangsmaterial, was als befriedigend angesehen werden kann (1).

3.6. VERSUCHSBEDINGUNGEN UND VERSUCHSTECHNIK

Die Aufnahme von ^{75}Se -markiertem Selenat bzw. Selenit ($^{75}\text{Se-Na}_2\text{SeO}_4$, spezifische Aktivität: 190 MegaBe/mg Se, $^{75}\text{Se-Na}_2\text{SeO}_3$, spezifische Aktivität: 125 MegaBe/mg Se, Amersham, International, England), von ^{35}S -markiertem Sulfat ($^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$, spezifische Aktivität: 680 MegaBe/mg S, NEN, Boston, USA) sowie von ^3H -markierter Glukose ($^3\text{H-D-Glukose}$, spezifische Aktivität: 3.1 GigaBe/mg Glukose, NEN, Boston, USA) in BSMV wurde bei verschiedenen Inkubationszeiten sowie verschiedenen Inkubationsbedingungen gemessen. Die jeweilige Zusammensetzung der Versuchsansätze ist im Ergebnisteil genau beschrieben. Neben den dort beschriebenen Substanzen enthielten die Versuchsansätze entweder $4.1 \times 10^5 \text{ Be/ml } ^{75}\text{Se-Na}_2\text{SeO}_4$, $4.2 \times 10^5 \text{ Be/ml } ^{75}\text{Se-Na}_2\text{SeO}_3$, $3.3 \times 10^5 \text{ Be/ml } ^{35}\text{S-Na}_2\text{SO}_4$ bzw. $7.4 \times 10^5 \text{ Be/ml } ^3\text{H-D-Glukose}$. In den Versuchen mit Selenat, Selenit und Sulfat wurde die über die radioaktiven Substanzen zugeführte Substanzmenge bei der Berechnung

der Endkonzentration berücksichtigt. Bei den Versuchen mit D-Glukose konnte die über die ^3H -D-Glukose zugeführte Glukosemenge vernachlässigt werden ($< 1\%$).

Zu einem Inkubationsansatz von $20\ \mu\text{l}$ Versuchslösung wurden $10\ \mu\text{l}$ BSMV-Suspension zugegeben und gut durchmischt. Fünf s vor Ablauf der Inkubationszeit wurden $20\ \mu\text{l}$ des Ansatzes entnommen und nach Ablauf der vorgegebenen Zeit in $1\ \text{ml}$ eiskalte Stopplösung gegeben (Zusammensetzung, mmol/l : $154\ \text{NaCl}$, $10\ \text{HEPES}$, mit Tris auf $\text{pH } 7.4$ eingestellt), die in einer Schnellfiltrationsvorrichtung (Millipore, Kloten, CH) vorpipetiert war. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde sofort abgesaugt und mit $2 \times 3\ \text{ml}$ derselben Stopplösung nachgespült. Die Nullwerte erhielt man, indem man zu $20\ \mu\text{l}$ des entsprechenden BSM-Puffers $10\ \mu\text{l}$ der BSMV-Suspension gab und davon $20\ \mu\text{l}$ in die Absaugvorrichtung pipettierte, $20\ \mu\text{l}$ der verdünnten Versuchslösung (1 Teil des jeweiligen BSM-Puffers + 2 Teile Versuchslösung) hinzufügte und sofort, wie oben beschrieben, absaugte und nachspülte. Die gesamte Absaugzeit betrug $10\ \text{s}$ pro Probe.

Die Filter (Schleicher & Schüll AG, Feldbach, CH, $\phi\ 25\ \text{mm}$, Porengrösse $0.6\ \mu\text{m}$) wurden anschliessend in ein Zählfläschchen (Glukose- und Sulfatversuche) oder in ein Reagensröhrchen (Selenat- und Selenitversuche) überführt. Um die Aktivität der Versuchslösung zu erhalten, wurden die Filter vorgewaschen, in das Szintillationsfläschchen bzw. Reagensröhrchen verbracht und $20\ \mu\text{l}$ der oben beschriebenen verdünnten Versuchslösung zugeführt.

Die mit ^{75}Se markierten Proben wurden in einem γ -Zähler (Kontron AG, Zürich, CH) die mit ^{35}S bzw. ^3H markierten Proben nach Zugabe von $10\ \text{ml}$ Szintillationsflüssigkeit (Supertron, Kontron AG, Zürich, CH) in einem β -Zähler gemessen (BETA-matic, Kontron AG, Zürich, CH). Die Messung im γ -Zähler erfolgte sofort, die im β -Zähler nach kräftigem Schütteln der Proben und 3-4 h Wartezeit. Die Zähldauer betrug jeweils $10\ \text{min}$ pro Probe.

3.7. BERECHNUNG DER SUBSTRATAUFNAHME IN DIE VESIKEL

Zur Ermittlung der Aufnahme von Selen, Sulfat und Glukose in die Vesikel dienen die Impulsraten (Impulse/min = I_{pm}) der Proben. Der erste Schritt bestand in der Berechnung der Mittelwerte aus den für jede Inkubationszeit ermittelten Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen und deren Korrektur durch Subtraktion des Nullwertes. Da der Anteil der markierten Substanz proportional zur Gesamtmenge des aufgenommenen Substrates ist, entspricht bei einer geforderten Substratkonzentration von 1 mmol/l der Versuchslösung die Zählrate der Versuchslösung dieser Konzentration. Die Substrataufnahme in die Vesikel, bezogen auf 1 mg Membranprotein, errechnet sich aus der folgenden Formel, die aus mehreren Dreisätzen resultiert:

$$\text{Aufnahme} = \frac{I_{pm_{\text{Probe}}} \times 3 \times 10^6 \times \text{Substratkonzentration (mmol/l)}}{I_{pm_{\text{Versuchslösung}}} \times \text{Protein (mg/ml)}}$$

(pmol/mg Protein)

3.8. STATISTIK

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben. Im allgemeinen wurde für die statistische Auswertung der Ergebnisse der Mann-Whitney U-Test herangezogen (49). Die Resultate der Versuche, die zur Prüfung des Einflusses von Thiosulfat, D-Glukose und L-Alanin auf den Na^+ -abhängigen Selenattransport durchgeführt wurden, wurden mit dem Wilcoxon matched pair signed rank Test für abhängige Stichproben statistisch ausgewertet (49). Als Signifikanzgrenze wurde dabei $p < 0.05$ festgelegt.

4. ERGEBNISSE

4.1. FUNKTIONSPRUEFUNG DER BSMV

Zur Funktionsprüfung der BSMV wurde der Na^+ -abhängige D-Glukose-Transport in die jejunalen BSMV vom Schwein und Schaf untersucht. Dieser aktive Transportprozess ist auf die BSM der intestinalen Epithelzellen beschränkt (29). Die konzentrierte Aufnahme von D-Glukose (0.1 mmol/l) in Gegenwart eines Na^+ -Gradienten von 100 mmol/l ($\text{Na}^+_{\text{aus}} > \text{Na}^+_{\text{in}}$) ist in Abbildung 1 dargestellt. Sowohl die Vesikel von den Schweinen als auch die von den Schafen akkumulierten D-Glukose über den Gleichgewichtswert (30 min Inkubation) hinaus. Die maximale Aufnahme (overshoot) erfolgte beim Schwein nach einer Inkubationszeit von 30 s, beim Schaf nach 60 s. Das overshoot/Gleichgewichtsverhältnis betrug 9 (Schwein) bzw. 4 (Schaf). Somit zeigten die von uns isolierten Vesikel den typischen Verlauf der D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten (29,40). Die Vesikel waren somit funktionsfähig.

4.2. Na^+ -ABHAENGIGKEIT DER AUFNAHME VON SELENAT UND SELENIT IN BSMV VON VERSCHIEDENEN DUENNDARMABSCHNITTEN DES SCHWEINES

Die Zeitverläufe der SeO_4^{2-} -Aufnahme bzw. SeO_3^{2-} -Aufnahme in aus dem Duodenum, Jejunum und Ileum des Schweines isolierte BSMV sind in Tabelle 1 dargestellt. Dabei wurde die SeO_4^{2-} -Aufnahme sowie die Aufnahme von SeO_3^{2-} einerseits bei Vorhandensein eines in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten, andererseits bei Vorhandensein eines in die Vesikel gerichteten K^+ -Gradienten untersucht.

Die Inkubationsansätze wiesen folgende Zusammensetzung auf (mmol/l): 100 D-Mannit, 100 NaCl bzw. 100 KCL, 20 HEPES/Tris sowie 0.04 SeO_4^{2-} bzw. 0.05 SeO_3^{2-} . Der pH-Wert betrug 7.4.

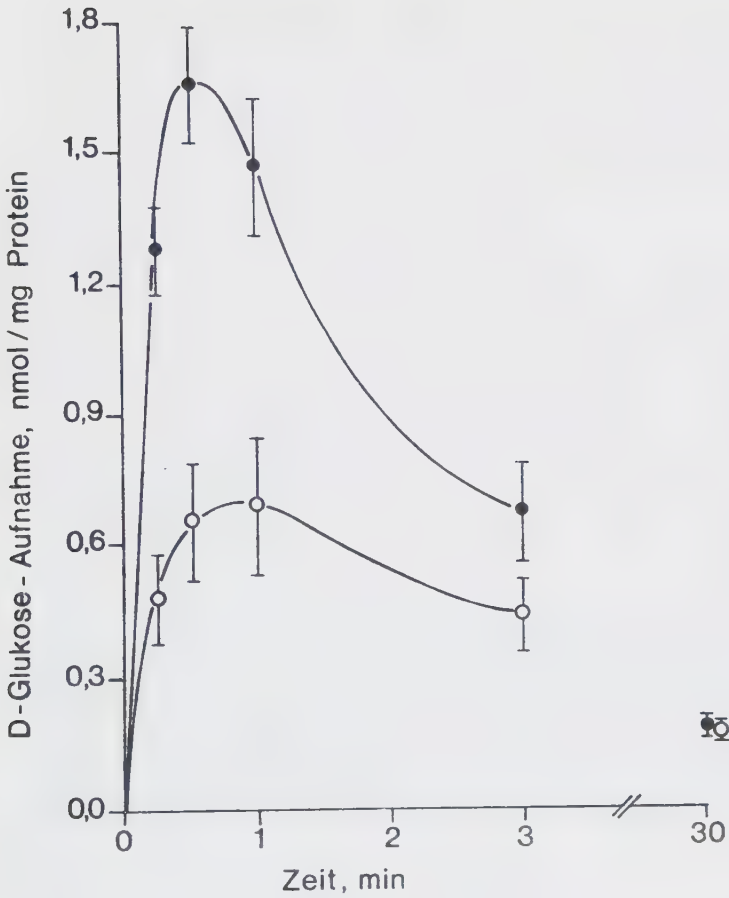


ABBILDUNG 1: ZEITVERLAUF DER D-GLUKOSE-AUFNAHME (KONZENTRATION VON D-GLUKOSE: 0.1 mmol/l) IN JEJUNALE BSMV VOM SCHWEIN (●, N = 7) UND SCHAF (○, N = 3) IN ANWESENHEIT EINES IN DIE VESIKEL GERICHTETEN Na^+ -GRADIENTEN VON 100 mmol/l.

Sowohl im Jejunum als auch im Ileum ergaben sich nach einer Inkubation von 15s, 30s, 1 min und 3 min signifikant ($p < 0.05$) höhere SeO_4^{2-} -Aufnahmen in die BSMV bei Vorhandensein eines in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten im Vergleich zu den Aufnahmen unter K^+ -Gradienten-Bedingungen (Tabelle 1). Dagegen zeigte die SeO_4^{2-} -Aufnahme in die aus dem Duodenum isolierten BSMV keine Na^+ -Abhängigkeit (Tabelle 1). Die SeO_4^{2-} -Aufnahme bei Vorhandensein eines Na^+ -Gradienten war im Jejunum und Ileum signifikant ($p < 0.05$) höher als im Duodenum (Tabelle 1). Ferner ergaben sich bezüglich der Na^+ -unabhängigen SeO_4^{2-} -Aufnahme (K^+ -Gradienten-Bedingungen) keine Unterschiede zwischen Duodenum, Jejunum und Ileum. In Bezug auf die SeO_3^{2-} -Aufnahme ergaben sich weder Unterschiede zwischen den untersuchten Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum), noch zwischen Na^+ - und K^+ -Gradienten-Bedingungen (Tabelle 1). Da die aus dem Jejunum des Schweines isolierten BSMV die höchsten SeO_4^{2-} -Aufnahmeraten ergaben, wurden für die folgenden Versuche nur noch aus diesem Darmabschnitt isolierte BSMV verwendet.

In zusätzlichen Experimenten wurde die Na^+ -abhängige SeO_4^{2-} -Aufnahme in jejunale BSMV des Schweines einerseits bei Vorhandensein eines transmembranalen Na^+ -Gradienten von 100 mmol/l ($\text{Na}^+_{\text{ausen}} > \text{Na}^+_{\text{innen}}$), andererseits bei Vorliegen eines Na^+ -Gleichgewichts von 100 mmol/l ($\text{Na}^+_{\text{ausen}} = \text{Na}^+_{\text{innen}}$) untersucht. Dabei ergab sich eine deutlich höhere SeO_4^{2-} -Aufnahme in Gegenwart des Na^+ -Gradienten verglichen mit der Aufnahme unter Na^+ -Gleichgewichtsbedingungen (Abbildung 2).

TABELLE 1: ZEITVERLAUF DER SELENAT- UND SELENIT-AUFNAHME IN AUS DEM DUODENUM, JEJUNUM UND ILEUM DES SCHWEINES ISOLIERTE BSMV

SUBSTRAT	INKUBATIONS-	DUODENUM (pmol/mg Protein)		JEJUNUM (pmol/mg Protein)		ILEUM (pmol/mg Protein)	
(mmol/l)	DAUER	Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺
SeO ₄ ²⁻ (0.04)	15 s	19.9 ± 3.1	17.6 ± 1.8	45.8 ± 9.8*	16.8 ± 1.8	36.6 ± 3.4*	18.1 ± 1.7
	30 s	24.3 ± 2.8	21.9 ± 2.4	72.7 ± 14.6*	26.7 ± 3.8	59.0 ± 4.8*	25.0 ± 2.7
	1 min	30.3 ± 3.8	31.3 ± 4.7	103.0 ± 20.2*	34.6 ± 6.3	78.0 ± 6.3*	33.5 ± 3.1
	3 min	42.3 ± 4.4	42.6 ± 2.7	129.0 ± 29.0*	54.5 ± 2.6	90.4 ± 2.2*	50.1 ± 4.1
	30 min	85.4 ± 12.2	80.8 ± 12.0	132.0 ± 19.6	110.7 ± 11.3	112.6 ± 10.5	110.0 ± 12.2
SeO ₃ ²⁻ (0.05)	15 s	624 ± 149	603 ± 43	609 ± 43	632 ± 44	537 ± 59	579 ± 14
	30 s	902 ± 146	893 ± 167	921 ± 66	960 ± 55	803 ± 91	807 ± 39
	1 min	1236 ± 190	1350 ± 195	1265 ± 85	1435 ± 104	1087 ± 123	1156 ± 97
	3 min	1983 ± 354	1997 ± 434	2293 ± 788	2408 ± 278	1788 ± 123	1872 ± 82
	30 min	6503 ± 1843	7145 ± 1950	6418 ± 773	6730 ± 930	5365 ± 280	6233 ± 293

Anzahl der Versuche = 5

*) signifikant ($p < 0.05$) grösser als die entsprechenden Aufnahmen in duodenale BSMV sowie signifikant ($p < 0.05$) grösser als die unter K⁺-Gradienten-Bedingungen erhaltenen Werte.

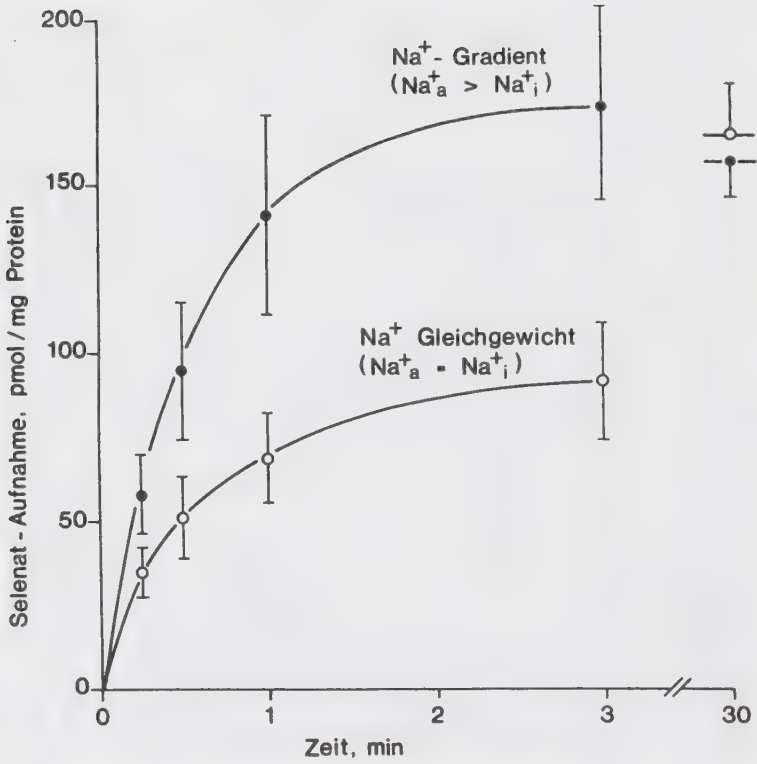


ABBILDUNG 2: Na^+ -ABHÄNGIGE AUFNAHME VON SELENAT (KONZENTRATION VON SELENAT: 0.04 mmol/l) IN ISOLIERTE JEJUNALE BSMV VOM SCHWEIN; (N = 3).

4.3. Na^+ -ABHÄNGIGKEIT DER SELENAT - BZW. SELENITAUFNAHME IN BSMV VOM JEJUNUM DES SCHAFES UND ILEUM DER RATTE

Die Zeitverläufe der Selenat- bzw. Selenitaufnahme in BSMV vom Jejunum des Schafes bzw. vom Ileum der Ratte sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Versuche wurden ebenfalls unter den in 4.2. beschriebenen Inkubationsbedingungen durchgeführt.

Sowohl beim Schaf wie auch bei der Ratte ergab sich in Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten initialen Na^+ -Gradienten bei kürzerer Inkubation eine höhere SeO_4^{2-} -Aufnahme (Konzentration von SeO_4^{2-} : 0.04 mmol/l) als bei Vorhandensein eines K^+ -Gradienten. Die SeO_3^{2-} -Aufnahme (Konzentration: 0.05 mmol/l) zeigte weder beim Schaf noch bei der Ratte eine Na^+ -Abhängigkeit (Tabelle 2).

4.4. BINDUNG VON SELENAT BZW. SELENIT AN DIE BSMV

Erhöht man die Osmolarität im Inkubationsmedium, so führt dies bei Vorhandensein von intakten BSMV zu einem Schrumpfen der Vesikel, was wiederum zu einer Abnahme des Vesikellumens und somit zu einer geringeren Substrataufnahme unter Gleichgewichtsbedingungen führt (27). Extrapoliert man die dabei erhaltenen Geraden gegen eine unendlich hohe Osmolarität, so erhält man ein Mass für die Substratbindung an die Vesikel, da bei einer unendlich hohen Osmolarität die Vesikel völlig kollabiert wären (27). Eine eventuelle Aufnahme wäre dann auf Bindung an die Membran zurückzuführen.

Die SeO_4^{2-} -bzw. SeO_3^{2-} -Aufnahme wurde nach 30-minütiger Inkubation bei steigender Osmolarität im Inkubationsmedium gemessen. Die Inkubationsansätze wiesen folgende Zusammensetzung auf (mmol/l): 100 NaCl, 20 HEPES/Tris, Mannit in unterschiedlichen Konzentrationen (200, 300, 500, 720), 0.04 SeO_4^{2-} bzw. 0.05 SeO_3^{2-} . Der pH-Wert betrug 7.4.

Bei aus dem Schweine-, Schaf- sowie aus dem Rattendarm isolierten BSMV ergab sich jeweils eine lineare Beziehung zwischen der Aufnahme von SeO_4^{2-} und der Osmolarität im Inkubationsansatz (Abbil-

TABELLE 2: ZEITVERLAUF DER SELENAT- BZW. SELENIT-AUFNAHME IN INTESTINALE BSMV VON SCHAF (JEJUNUM) UND RATTE (ILEUM)

SUBSTRAT (Konzentration, mmol/l)	INKUBATIONSDAUER	SCHAF (Jejunum) ¹⁾		RATTE (Ileum) ²⁾	
		Na ⁺	pmol/mg Protein K ⁺	Na ⁺	pmol/mg Protein K ⁺
SeO ₄ ²⁻ (0.04)	15 s	19.4 ± 1.7	13.0 ± 1.5	43.2	24.4
	30 s	25.1 ± 0.6	16.8 ± 0.2	54.8	28.0
	1 min	35.0 ± 1.5	23.3 ± 1.9	64.0	46.4
	3 min	54.1 ± 5.1	34.2 ± 1.9	68.8	73.2
	30 min	78.5 ± 2.4	74.3 ± 2.5	90.8	94.8
SeO ₃ ²⁻ (0.05)	15 s	2377 ± 418	2521 ± 383	2130	2195
	30 s	3319 ± 308	3537 ± 137	3590	3765
	1 min	4648 ± 213	4726 ± 227	5720	5931
	3 min	6647 ± 244	6585 ± 444	9975	10165
	30 min	7344 ± 127	7848 ± 109	15725	16113

1) Anzahl der Versuche = 3

2) Die Werte wurden aus einem Einzelerperiment (Dreifachbestimmungen) erhalten; die BSMV wurden aus dem Ileum von 8 Ratten isoliert.

dung 3A). Dabei führte eine Erhöhung der Osmolarität zu einer Verminderung der SeO_4^{2-} -Aufnahme. Abbildung 3A zeigt, dass die extrapolierten Geraden der SeO_4^{2-} -Aufnahme bei steigender Osmolarität die y-Achse in der Nähe des Nullpunktes schneiden. Dies bedeutet, dass es sich bei den erhaltenen Werten der SeO_4^{2-} -Aufnahme um eine Aufnahme in das Vesikellumen und keine Bindung an die Vesikelmembran handelt.

Bei den Versuchen mit SeO_3^{2-} zeigte sich hingegen keine Abhängigkeit der SeO_3^{2-} -Aufnahme von der Osmolarität des Inkubationsmediums (Abbildung 3B). Die erhaltene Gerade verläuft nahezu parallel zur x-Achse. Somit handelt es sich bei der " SeO_3^{2-} -Aufnahme" offensichtlich ausschliesslich um Bindung von SeO_3^{2-} an die Vesikelmembran.

Die auf 1mg Membranprotein bezogene Aufnahme von SeO_3^{2-} ergab zwischen der Ratte einerseits und Schwein und Schaf andererseits erhebliche Unterschiede (Abbildung 3B). In weiteren Experimenten zeigte sich für die Bindung von SeO_3^{2-} an die Vesikelmembran zumindest bei 30-minütiger Inkubation keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Inkubationsansatz (Abbildung 4B). Dagegen bestand zwischen der SeO_4^{2-} -Aufnahme und dem Proteingehalt der Vesikelsuspension eine direkte lineare Beziehung (Abbildung 4A). Die erheblich "höhere" Bindung von SeO_3^{2-} pro mg Protein an die aus dem Rattendarm isolierten Vesikel kommt somit durch den unterschiedlichen Proteingehalt der Vesikelpräparation zustande (Ratte: 8 mg/ml, Schwein und Schaf: 15 mg/ml). Somit bestehen zwischen den drei untersuchten Spezies bei gleicher Proteinkonzentration des Inkubationsansatzes wahrscheinlich keine Unterschiede in Bezug auf die Menge des gebundenen SeO_3^{2-} .

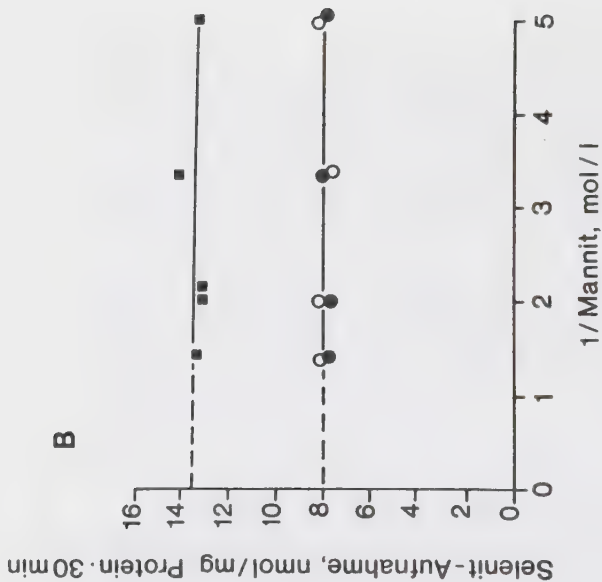
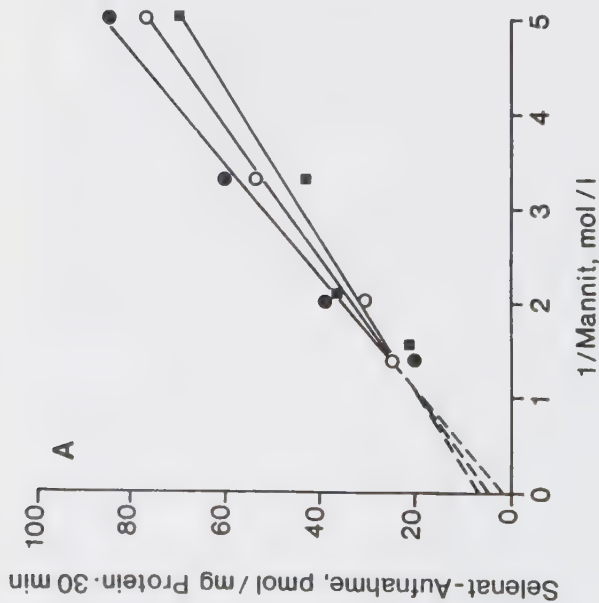


ABBILDUNG 3: ABHÄNGIGKEIT DER AUFNAHME VON SELENAT (A, KONZENTRATION: 0.04 mmol/l) UND SELENIT (B, KONZENTRATION: 0.05 mmol/l) IN JEJUNALE BSMV VOM SCHWEIN (●) UND SCHAF (○) BZW. ILEALE BSMV VON DER RATTE (■) VON DER OSMOLARITÄT IM INKUBATIONSMEDIUM. DIE OSMOLARITÄT WURDE MIT VERSCHIEDENEN MANNIT-KONZENTRATIONEN EINGESTELLT; (N = 2).

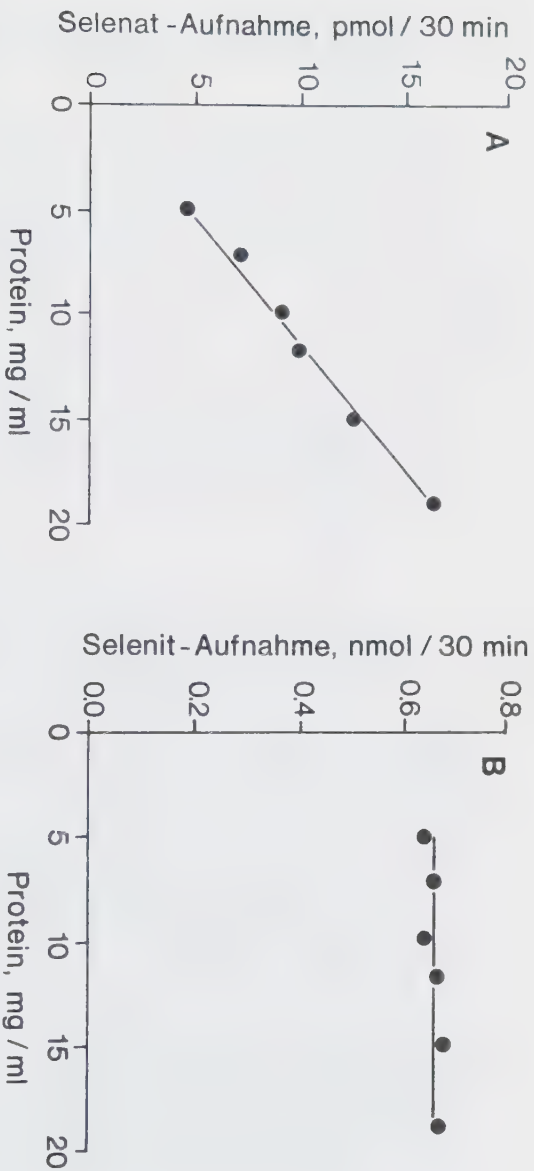


ABBILDUNG 4: ABHÄNGIGKEIT DER AUFNAHME VON SELENAT (A , KONZENTRATION VON SELENAT: 0.04 mmol/l) UND SELENIT (B , KONZENTRATION VON SELENIT: 0.05 mmol/l) VON DER PROTEINKONZENTRATION IN DER BSMV-SUSPENSION AUS DEM JEJUNUM DES SCHWEINES.

Die Werte wurden aus einem Einzelexperiment (Dreifachbestimmungen) erhalten; die Vesikel wurden von einem Tier isoliert und die jeweilige Proteinkonzentration wurde durch Verdünnung der Vesikelsuspension mit BSM-Puffer eingestellt.

4.5. EINFLUSS VON THIOSULFAT AUF DIE SELENATAUFNAHME IN BSMV VOM SCHWEIN

In Abbildung 5 sind die Zeitverläufe der SeO_4^{2-} -Aufnahme in jejunale BSMV vom Schwein in Anwesenheit von 1 mmol/l bzw. 10 mmol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dargestellt. Die Inkubationsansätze wiesen einen in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten von 100 mmol/l auf und enthielten überdies 100 mmol/l D-Mannit, 20 mmol/l HEPES/Tris sowie 0.04 mmol/l SeO_4^{2-} . Der pH-Wert betrug 7.4.

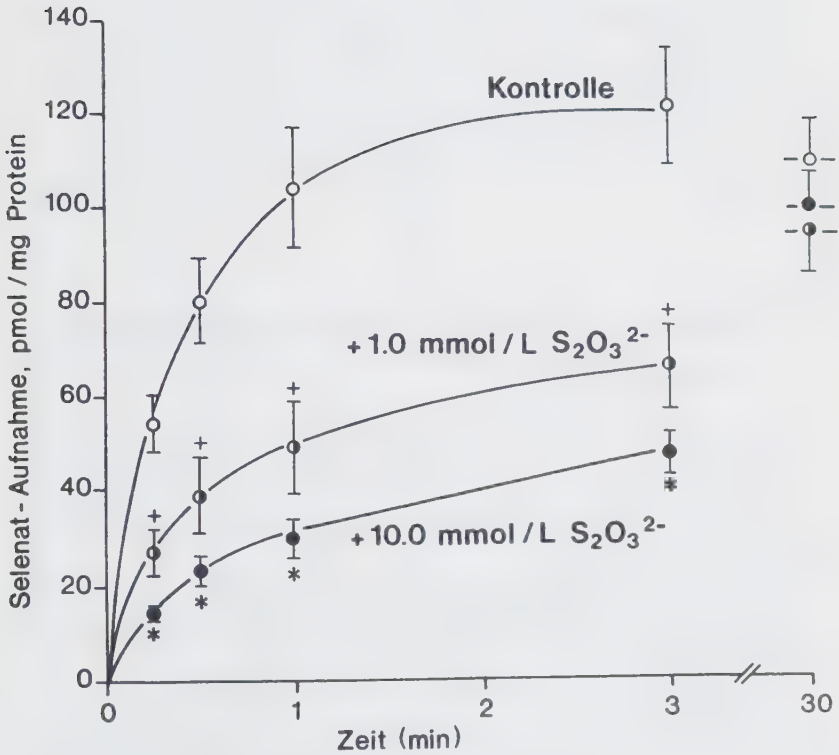
Bei Anwesenheit von 1 mmol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ im Inkubationsansatz ergab sich eine signifikante ($p < 0.05$) Hemmung der initialen SeO_4^{2-} -Aufnahme in die Vesikel. Die Gleichgewichtswerte waren dagegen nicht signifikant verschieden (Abbildung 5). In Gegenwart von 10 mmol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ war die Hemmung der SeO_4^{2-} -Aufnahme noch stärker ausgeprägt ($p < 0.002$, Abbildung 5).

4.6. EINFLUSS VON SELENAT AUF DIE SULFATAUFNAHME

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass SO_4^{2-} und $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ die intestinale SeO_4^{2-} -Absorption hemmen (5,62). Wir haben deshalb in zusätzlichen Experimenten geprüft, ob auch die SO_4^{2-} -Aufnahme durch SeO_4^{2-} gehemmt werden kann.

Die SO_4^{2-} -Aufnahme in die jejunalen BSMV vom Schwein bei Vorhandensein eines transmembranalen Na^+ -Gradienten in Höhe von 100 mmol/l wurde einerseits in Gegenwart von 10 mmol/l Na_2SeO_4 , andererseits ohne Zusatz untersucht (Abbildung 6A). Ferner wurde auch die SO_4^{2-} -Aufnahme unter K^+ -Gradienten-Bedingungen gemessen. Die Inkubationsansätze enthielten überdies (mmol/l): 100 D-Mannit, 20 HEPES/Tris sowie 0.04 Na_2SeO_4 . Der pH-Wert betrug 7.4.

Der Na^+ -Gradient stimulierte die SO_4^{2-} -Aufnahme im Vergleich zur Aufnahme unter K^+ -Gradienten-Bedingungen deutlich. Die SO_4^{2-} -Aufnahme in Gegenwart von 10 mmol/l Na_2SeO_4 unterschied sich nicht von der Na^+ -unabhängigen SO_4^{2-} -Aufnahme (K^+ -Gradienten-Bedingungen).



+ signifikanter Unterschied ($p < 0.05$)
* " " ($p < 0.002$)

ABBILDUNG 5: HEMMUNG DER SELENATAUFNAHME (KONZENTRATION VON SELENAT: 0.04 mmol/l) IN JEJUNALE BSMV VOM SCHWEIN DURCH THIOSULFAT ($S_2O_3^{2-}$) IN EINER KONZENTRATION VON 1 mmol/l BZW. 10 mmol/l ; (N = 7).

Somit hemmte 10 mmol/l SeO_4^{2-} die Na^+ -abhängige SO_4^{2-} -Aufnahme vollständig (Abbildung 6A).

Zur Überprüfung eines möglichen unspezifischen Hemmeffektes von SeO_4^{2-} in einer höheren Konzentration auf Na^+ -abhängige Transportprozesse wurde der Zeitverlauf der D-Glukose-Aufnahme (0.1 mmol/l) mit und ohne Zusatz von 10 mmol/l Na_2SeO_4 untersucht. Es ergaben sich in Bezug auf die D-Glukoseaufnahme keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Versuchsbedingungen (Abbildung 6B).

4.7. EINFLUSS VON D-GLUKOSE UND L-ALANIN AUF DIE SELENATAUFNAHME IN BSMV VOM SCHWEIN

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde der Einfluss von D-Glukose bzw. L-Alanin auf die SeO_4^{2-} -Aufnahme in jejunale BSMV vom Schwein untersucht. Sowohl D-Glukose als auch L-Alanin werden über jeweils spezifische Na^+ -abhängige Transportmechanismen durch die BSM transportiert.

Die Inkubationslösungen wiesen folgende Zusammensetzung auf (mmol/l): 100 D-Mannit, 100 NaCl, 20 HEPES/Tris, 10 D-Glukose bzw. 10 L-Alanin sowie 0.04 SeO_4^{2-} . Der pH-Wert betrug 7.4.

Tabelle 3 zeigt, dass die initiale SeO_4^{2-} -Aufnahme (15 s - 1 min) sowohl in Gegenwart von 10 mmol/l D-Glukose als auch in Gegenwart von 10 mmol/l L-Alanin signifikant ($p < 0.05$) niedriger war als in den entsprechenden Kontrollversuchen. Die bei 3- bzw. 30-minütiger Inkubation erhaltenen Aufnahmewerte waren dagegen nicht voneinander verschieden.

4.8. Na^+ -UNABHÄNGIGE SELENATAUFNAHME

Die Na^+ -unabhängige SeO_4^{2-} -Aufnahme wurde unter K^+ -Gleichgewichts- und unter Cholin⁺-Gleichgewichts-Bedingungen (100 mmol/l) gemessen.

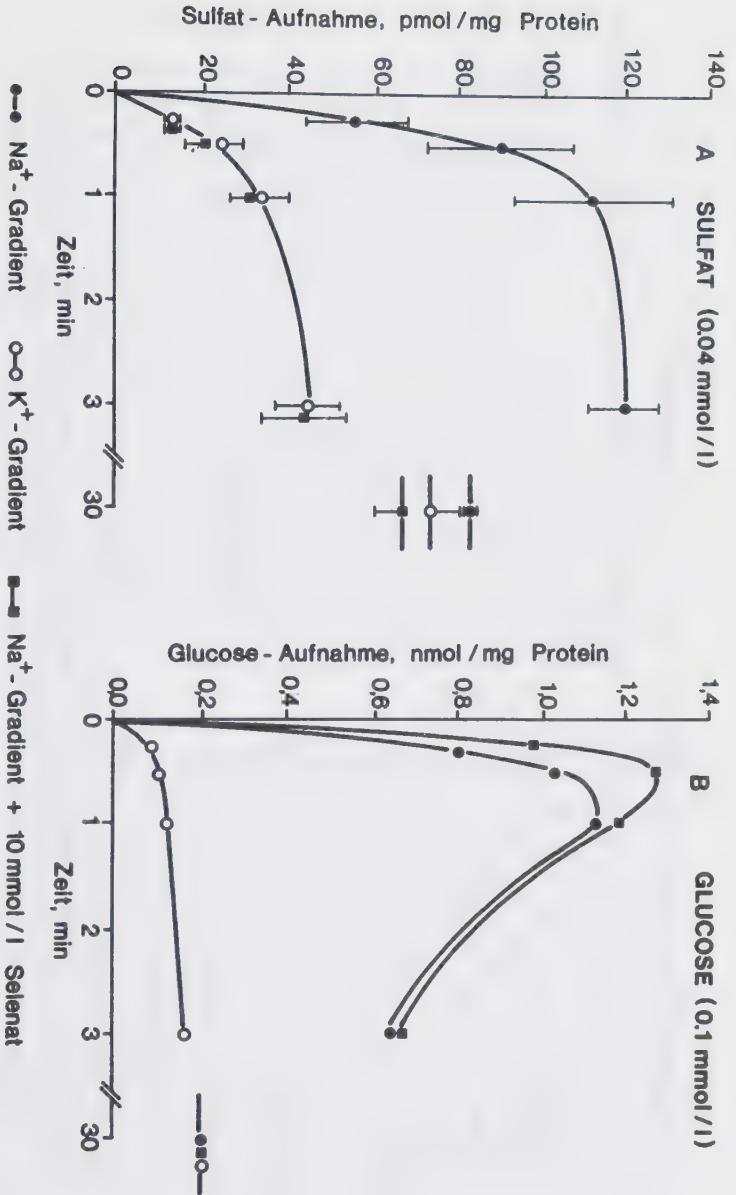


ABBILDUNG 6: EINFLUSS VON SELENAT (KONZENTRATION: 0.04 mmol/l) AUF DIE SULFATAUFNAHME (KONZENTRATION: 0.04 mmol/l; A) BZW. DIE D-GLUKOSEAUFNAHME (KONZENTRATION: 0.1 mmol/l; B) IN JEJUNALE BSMV VOM SCHWEIN; N = 3).

TABELLE 3: EINFLUSS VON D-GLUKOSE UND L-ALANIN AUF DIE SELENATAUFNAHME

INKUBATIONSDAUER	AUFNAHME ¹⁾ + 10 mmol/l D-GLUKOSE		+ 10 mmol/l L-ALANIN
	KONTROLLE	pmol/mg Protein	
15 s	52.4 ± 10.0	43.9 ± 8.8 ³⁾	49.1 ± 10.0 ³⁾
30 s	78.4 ± 14.6	57.0 ± 9.2 ³⁾	67.5 ± 13.0 ³⁾
1 min	102.0 ± 22.0	85.4 ± 14.6 ³⁾	84.4 ± 14.7 ³⁾
3 min	119.0 ± 20.0	99.1 ± 15.0	98.6 ± 16.1
30 min	92.4 ± 7.2	90.9 ± 8.2	87.5 ± 6.9

1) Anzahl der Versuche = 6

2) Inkubationsbedingungen (mmol/l): 100 NaCl, 100 D-Mannit, 20 HEPES/Tris, pH 7.4, 0.04 SeO_4^{2-}

3) signifikant ($p < 0.05$) niedriger als die entsprechenden Aufnahmen unter Kontrollbedingungen.
(Wilcoxon matched pair signed rank Test)

Dazu wurden die Vesikel mit folgenden Puffern vorbeladen: 100 mmol/l KCl bzw. 100 mmol/l Cholin-Cl, 100 mmol/l D-Mannit sowie 20 mmol/l HEPES/Tris. Der pH-Wert betrug 7.4. Die Zusammensetzung der Inkubationslösung war in diesen Experimenten mit Ausnahme des zusätzlich im Inkubationsmedium vorhandenen Na_2SeO_4 (0.04 mmol/l) identisch mit dem Medium innerhalb der Vesikel (Gleichgewichtsbedingungen). In Tabelle 4 ist die SeO_4^{2-} -Aufnahme unter diesen Bedingungen dargestellt. Da sich die Aufnahme unter K^+ -Gleichgewichtsbedingungen ebenso wie die Aufnahme unter K^+ -Gradientenbedingungen ($\text{K}^+_{\text{aus}} > \text{K}^+_{\text{in}}$) nicht von der SeO_4^{2-} -Aufnahme unter Cholin^+ -Gleichgewichtsbedingungen unterschied (Tabelle 4), kann daraus geschlossen werden, dass K^+ unter diesen Bedingungen keinen spezifischen Effekt auf die SeO_4^{2-} -Aufnahme in die BSMV ausübt. Zusätzlich weisen die Experimente darauf hin, dass die Na^+ -abhängige SeO_4^{2-} -Aufnahme in Gegenwart von 10 mmol/L $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (siehe 4.5.) völlig gehemmt wurde, da die SeO_4^{2-} -Aufnahme unter diesen Bedingungen sich nicht von der SeO_4^{2-} -Aufnahme unter K^+ -Gradienten-, K^+ -Gleichgewichts- und Cholin-Gleichgewichts-Bedingungen unterschied.

4.9. POTENTIALABHÄNGIGKEIT DER SELENATAUFNAHME IN BSMV VOM SCHWEIN

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche wurden durchgeführt, um einen möglichen Einfluss einer transmembranalen Potentialdifferenz (PD) auf die Na^+ -abhängige bzw. Na^+ -unabhängige SeO_4^{2-} -Aufnahme in jejunale BSMV vom Schwein zu untersuchen. Dazu wurde die SeO_4^{2-} -Aufnahme sowohl entlang einer transmembranalen PD (Innenseite: positiv) als auch gegen eine transmembranale PD (Innenseite: negativ) gemessen. Es handelte sich dabei um mit Hilfe von Valinomycin (Sigma, St.Louis, USA) induzierte K^+ -Diffusionspotentiale. Valinomycin erhöht selektiv die K^+ -Permeabilität der BSM. Das Gegenion (in diesem Fall Glukonat $^-$) von K^+ kann die Membran nur schlecht passieren, wodurch sich ein K^+ -Diffusionspotential aufbaut. Die Zusammensetzung des zur Vorbeladung der Vesikel verwendeten Mediums sowie des Inkubationsmediums (Ausienmedium) ist in

TABELLE 4: VERGLEICH DER Na^+ -UNABHÄNGIGEN MIT DER Na^+ -ABHÄNGIGEN SELENATAUFNAHME

INKUBATIONSBEDINGUNG	ZEITVERLAUF DER SeO_4^{2-} -AUFNAHME, pmol/mg Protein				
	15 s	30 s	1 min	3 min	30 min
Na^+ -Gradient ¹⁾	36,1 $\pm$ 0,2	54,6 $\pm$ 1,4	71,5 $\pm$ 2,7	71,5 $\pm$ 2,7	97,4 $\pm$ 0,4
Na^+ -Gradient + 10 mmol/l SD_3^{2-}	15,2 $\pm$ 0,7	21,8 $\pm$ 1,8	23,9 $\pm$ 0,6	34,1 $\pm$ 1,6	74,0 $\pm$ 0,8
K^+ -Gradient	18,7 $\pm$ 0,5	24,5 $\pm$ 1,3	30,5 $\pm$ 0,4	45,3 $\pm$ 1,9	88,2 $\pm$ 6,3
K^+ -Gleichgewicht	17,5 $\pm$ 1,5	25,8 $\pm$ 2,4	35,1 $\pm$ 3,3	56,0 $\pm$ 3,2	112,0 $\pm$ 9,0
Cholin-Gleichgewicht	13,3 $\pm$ 0,9	21,0 $\pm$ 0,8	27,3 $\pm$ 1,2	38,5 $\pm$ 4,4	84,9 $\pm$ 5,8

1) Alle unter Na^+ -Gradienten-Bedingungen erhaltenen Werte waren höher als die entsprechenden unter den übrigen Versuchs-Bedingungen erhaltenen Werte mit Ausnahme des Gleichgewichtswertes (30 min); je drei Versuche bei jeder Bedingung.

Tabelle 5 aufgeführt.

Um zu prüfen, ob in den Versuchsansätzen Diffusionspotentiale in der gewünschten Richtung vorhanden waren, wurde ein Kontrollversuch mit D-Glukose durchgeführt, da der Na^+ /Glukose-Transport ein elektrogener und somit potentialsensitiver Transport ist (41). Eine transmembranale PD mit positiver Membraninnenseite bewirkte dabei eine sehr deutliche Depression der Na^+ -abhängigen D-Glukose-Aufnahme, verglichen mit der Aufnahme bei Bestehen einer umgekehrten PD (Abbildung 7B). Abbildung 7A zeigt, dass die Na^+ -abhängige SeO_4^{2-} -Aufnahme durch eine transmembranale PD nicht wesentlich beeinflusst wurde, da die bei einem gegenüber der Vesikelaussenseite positiven Vesikellumen bzw. bei umgekehrten Verhältnissen erhaltenen Aufnahmeverläufe nicht voneinander verschieden waren. Dagegen ergab sich für die Na^+ -unabhängige SeO_4^{2-} -Aufnahme eine deutliche Abhängigkeit von der transmembranalen PD, da die SeO_4^{2-} -Aufnahme bei positiver Membraninnenseite gegenüber der Membranaussenseite deutlich grösser war als bei umgekehrter PD (Abbildung 7A).

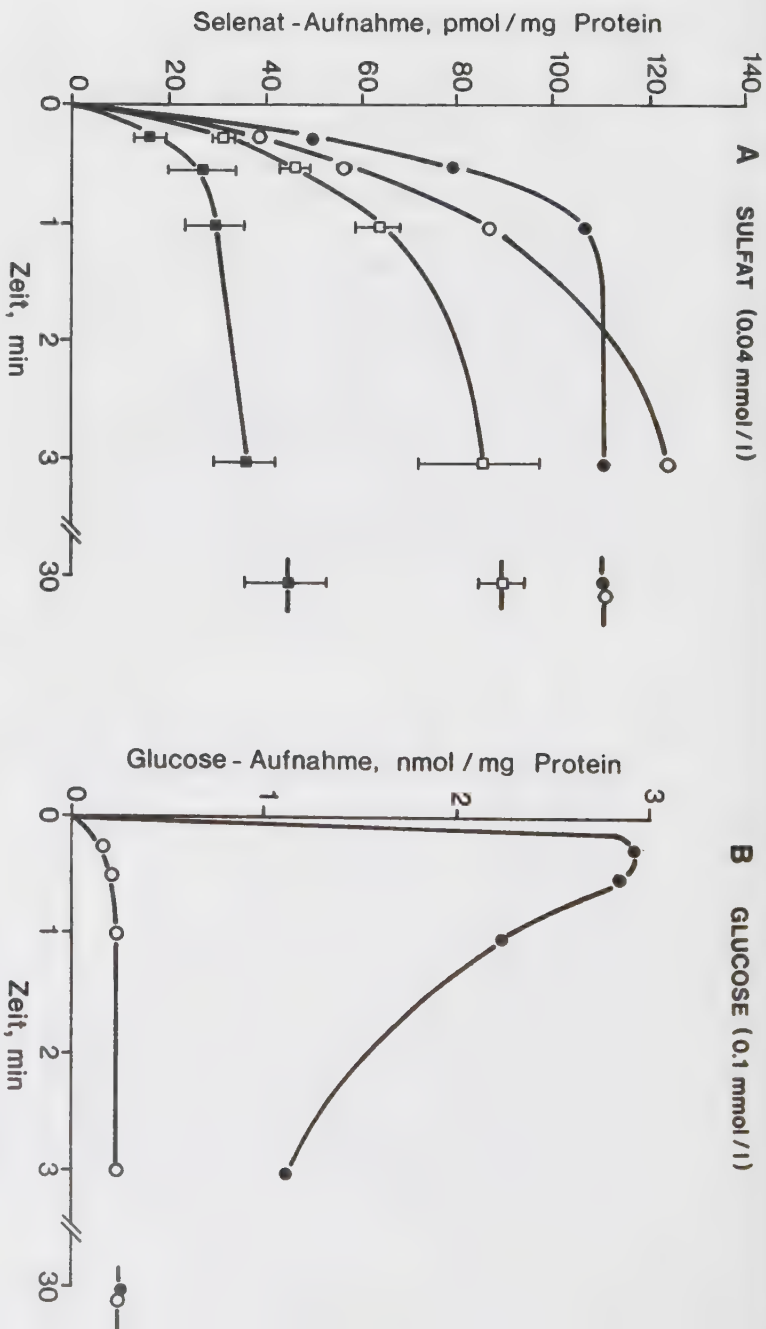


ABBILDUNG 7: EINFLUSS EINER TRANSMEMBRANALEN POTENTIALDIFFERENZ AUF DIE SELENAT - BZW. GLUKOSE-AUFNAHME IN JEJUNALE BSIV VOM SCHWEIN UNTER Na^+ -GRADIENTEN-BEDINGUNGEN (●, ○, N = 2) BZW. BEI FEHLEN VON Na^+ IM INKUBATIONSANSATZ (■, □, N = 3) ; (●, ■) = VESIKELINNESEITE NEGATIV, (○, □) = VESIKELINNESEITE POSITIV

TABELLE 5: ZUSAMMENSETZUNG DER AUSSEN- UND INNENMEDIENTEN FÜR DIE VERSÜCHE MIT DURCH VALINOMYCIN* INDUZIERTE K⁺-DIFFUSIONSPOTENTIALEN

INKUBATIONS- BEDINGUNGEN	MEMBRANINNENSEITE POSITIV		MEMBRANINNENSEITE NEGATIV	
	AUSSEN-MEDIUM ¹⁾ (mmol/l)	INNEN-MEDIUM ²⁾ (mmol/l)	AUSSEN-MEDIUM ¹⁾ (mmol/l)	INNEN-MEDIUM ²⁾ (mmol/l)
Na ⁺ -Gradient	133 D-Mannit 100 K-Glukonat 50 Na-Glukonat 20 HEPES/Tris 0.04 Na ₂ SeO ₄ bzw. 0.1 Glukose	400 D-Mannit - 20 HEPES/Tris	200 D-Mannit 50 K-Glukonat 50 Na-Glukonat 20 HEPES/Tris 0.04 Na ₂ SeO ₄ bzw. 0.1 D-Glukose	100 D-Mannit 150 K-Glukonat - 20 HEPES/Tris
K ⁺ -Gradient	133 D-Mannit 100 K-Glukonat 100 Cellulose 20 HEPES/Tris 0.04 Na ₂ SeO ₄	400 D-Mannit - 20 HEPES/Tris	200 D-Mannit 50 K-Glukonat 100 Cellulose 20 HEPES/Tris 0.04 Na ₂ SeO ₄	100 D-Mannit 150 K-Glukonat - 20 HEPES/Tris

*) Valinomycin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Versuchsansatz als äthanolische Lösung (Endkonzentration Äthanol: 1%) 30 min vor dem Versuch der BSM-Suspension zugesetzt.

1) Inkubationsmedium, Endkonzentration

2) Medium innerhalb der Vesikel, Endkonzentration

5. DISKUSSION

Die Resultate zeigen, dass die Selenataufnahme in BSMV aus dem Dünndarm des Schweines, mit Ausnahme des Duodenums, durch einen transmembranalen Na^+ -Gradienten ($\text{Na}^+_{\text{ausser}} > \text{Na}^+_{\text{innen}}$) stimuliert wird. Dabei ergaben sich zwischen Jejunum und Ileum keine wesentlichen Unterschiede. Für die Selenataufnahme in jejunale BSMV des Schafes und in ileale BSMV der Ratte konnte ebenfalls eine Na^+ -Abhängigkeit nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren in vivo-Experimenten an der Ratte (62) sowie in vitro-Untersuchungen am intakten Darmepithel von Ratte und Schaf (4,5), in denen, mit Ausnahme des Duodenums des Schafes, eine Na^+ -Abhängigkeit der Selenatabsorption im Dünndarm der Ratte und des Schafes nachgewiesen werden konnte. Für das Schaf ergab sich dabei die höchste mucosale Selenataufnahme im Jejunum (5) und für die Ratte im Ileum (62). Allerdings konnte in den zitierten Untersuchungen aufgrund der Versuchsbedingungen lediglich eine Na^+ -, nicht aber eine Na^+ -Gradienten-Abhängigkeit der Selenatabsorption gezeigt werden. Eine Abhängigkeit des transmembranalen Substrattransports von einem transmembranalen Na^+ -Gradienten lässt sich nur in Vesikelexperimenten prüfen.

Die erhaltenen Werte für die Selenataufnahme in die BSMV repräsentieren eine Aufnahme in einen osmotisch reaktiven Raum. Dies wird durch die negative Korrelation zwischen der Osmolarität des Inkubationsansatzes und der Aufnahme von Selenat belegt, denn eine Erhöhung der Osmolarität führt durch Schrumpfen der Vesikel zu einer Verkleinerung des Vesikellumens und damit zu einer verringerten Aufnahme (27).

Im Vergleich zur Selenataufnahme fanden wir bei allen drei untersuchten Spezies eine wesentlich höhere "Selenit Aufnahme" in die BSMV. Allerdings zeigten die Versuche mit steigender Osmolarität im Inkubationsansatz (Abbildung 3), dass es sich im Fall der "Selenit Aufnahme" ausschliesslich um Bindung an die Membran handelt. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (4,5,39), in denen sich für die Selenitabsorption keine deutliche Na^+ -Abhängigkeit

nachweisen liess, bewirkte dabei ein in die Vesikel gerichteter Na^+ -Gradient keine Stimulierung der Selenitaufnahme. Die umfangreiche Bindung von Selenit an die Membran kann auf einer Reaktion von Selenit mit membranständigen SH-Gruppen beruhen, da Selenit einem reduktiven Stoffwechsel unterliegt, der ohne enzymatische Katalyse stattfindet (6,11). Ob in den in vivo-Versuchen von Wolfram et al. (62) am perfundierten Rattenileum sowie den in vitro-Versuchen von Ardüser et al. (5) an umgestülpten Ileumsäckchen Se aus Selenit gegenüber Selenat in grösserem Umfang vom Darmepithel gebunden wurde, ist nicht bekannt, da in den betreffenden Versuchen lediglich das Verschwinden von Selen aus dem Darmlumen bzw. der transepitheliale Transport von Selen gemessen wurde. Die Versuche an evertierten Darmsäckchen deuten jedoch darauf hin, dass Se bei Vorhandensein von Selenit im Inkubationsmedium in erheblichem Umfang in der Darmwand akkumulierte, da Se vom Darmepithel absorbiert wurde, ohne auf der serösen Seite wieder ins Inkubationsmedium abgegeben zu werden.

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass Selen und Schwefel teilweise gleiche Stoffwechselwege benützen und sich gegenseitig konkurrenzieren können (4,32,60). Für die Selenatabsorption im Dünndarm ergab sich in früheren Experimenten von Ardüser et al. (4) am Ileum der Ratte eine deutliche Hemmung durch Sulfat bzw. Thiosulfat. Die Autoren folgerten daraus, dass Sulfat, Thiosulfat und Selenat wahrscheinlich durch den gleichen Transportmechanismus in der Bürstensaummembran des Ileums transportiert werden. Cardin und Mason (9) fanden eine Hemmung des Sulfattransports im Ileum der Ratte durch Selenat, Molybdat und Wolfram. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thiosulfat (10 mmol/l) die Na^+ -abhängige Selenataufnahme (Konzentration: 0.04 mmol/l) in jejunale BSMV des Schweines hemmt (Abbildung 5). Dabei handelte es sich um eine vollständige Hemmung, denn die verbleibende Aufnahme unterschied sich nicht mehr von der Aufnahme unter K^+ -Gradienten-, K^+ -Gleichgewichts- und Cholin $^+$ -Gleichgewichts-Bedingungen (Tabelle 4). Zusätzlich wurde gezeigt, dass

sich die Na^+ -abhängige Sulfataufnahme (Konzentration: 0.04 mmol/l) durch Selenat (10 mmol/l) ebenfalls vollständig hemmen lässt (Abbildung 7). Eine unspezifische Schädigung der Vesikel durch Selenat (10 mmol/l) kann als Ursache für die reduzierte Sulfataufnahme in diesen Experimenten ausgeschlossen werden, da in Kontrollversuchen kein Einfluss von Selenat (10 mmol/l) auf die Glukose-Aufnahme nachweisbar war.

Unsere Ergebnisse zeigen somit, dass Selenat, Sulfat und Thiosulfat den gleichen Na^+ -abhängigen Transportmechanismus in der jejunalen BSM benutzen. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um das für Sulfat bereits beschriebene Na^+ -abhängige Transportsystem(1). Im Unterschied zu den Interaktionen von Thiosulfat, Sulfat und Selenat beruht die durch die Anwesenheit von D-Glukose bzw. L-Alanin im Inkubationsmedium induzierte relativ geringgradige Verminderung der Na^+ -abhängigen Selenataufnahme in jejunale BSMV des Schweines wahrscheinlich auf einer Konkurrenz um die gleiche Energiequelle, da der Transport von Glukose, Alanin und Selenat durch den transmembranalen Na^+ -Gradienten energetisiert werden. In Übereinstimmung mit den Vesikelversuchen hemmte L-Leucin in Versuchen am umgestülpten ilealen Darmsäckchen der Ratte den transepithelialen Selenattransport ebenfalls. Aus den Vesikelversuchen lässt sich somit ableiten, dass die Hemmung des transepithelialen Selenattransports durch Aminosäuren beim Transport durch die BSM stattfindet.

Verschiedene aktive Transportvorgänge, wie z.B. der intestinale Transport von Glukose oder neutralen Aminosäuren durch die BSM, werden ausser durch den chemischen Na^+ -Gradienten auch durch ein transmembranales elektrisches Potential beeinflusst (41), da der Carrier-Substrat- Na^+ -Komplex eine positive Ladung trägt. Im Unterschied dazu scheint die Na^+ -abhängige Selenataufnahme unabhängig von einer transmembranalen elektrischen Potentialdifferenz und somit elektroneutral abzulaufen. Auch der aktive intestinale Sulfattransport zeigt keine oder allenfalls nur eine geringe Potentialdifferenz-Abhängigkeit (30,35). Die Na^+ -unabhängige Komponente der Selenataufnahme in die Vesikel, die wahrscheinlich auf Diffu-

sion beruht, konnte dagegen durch eine elektrische Potentialdifferenz mit positiver Membraninnenseite deutlich stimuliert werden (Abbildung 6A).

Zusammenfassend wurde somit in dieser Arbeit gezeigt, dass bei Schwein, Schaf und Ratte im mittleren und distalen Dünndarm ein durch den transmembranalen Na^+ -Gradienten energetisierter Transport von Selenat durch die intestinale BSM existiert. Der Na^+ -abhängige Selenattransport ist dabei unabhängig von der transmembranalen elektrischen Potentialdifferenz und somit elektroneutral. Im Unterschied dazu stimulierte eine transmembranale Potentialdifferenz mit positiver Membraninnenseite den Na^+ -unabhängigen Transport von Selenat durch die BSM, der wahrscheinlich durch Diffusion erfolgt.

Aufgrund der Hemmung des Transports von Selenat durch Thio-sulfat und von Sulfat durch Selenat lässt sich schliessen, dass diese drei Anionen denselben Transportmechanismus in der BSM benutzen. Eine Aufnahme von Selenit in die BSMV konnte im Gegensatz zu Selenat nicht gemessen werden. Dagegen erfolgte eine umfangreiche Bindung von Selenit an die Membranen. Diese Bindung ist möglicherweise auf eine Reaktion von Selenit mit membranständigen SH-Gruppen zurückzuführen und dürfte die Absorption von Selen in Form von Selenit beeinträchtigen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das für Mensch und Tier essentielle Spurenelement Selen (Se) wird über die Nahrung überwiegend in proteingebundener Form (Selenoamino-säuren), zum geringen Teil aber auch in Form von Selensalzen aufgenommen. Vor allem in Selenmangelgebieten spielen die anorganischen Selensalze Selenat und Selenit in der Tierernährung eine wichtige Rolle, denn die Supplementierung selenarmer Futtermittel mit anorganischen Selensalzen hat sich als effektive und kostengünstige Präventivmassnahme zur Verhütung von Selenmangelkrankheiten bewährt. Ueber die Mechanismen der intestinalen Absorption von Selenat und Selenit ist allerdings noch relativ wenig bekannt.

Wir haben daher den Transport von Selenat und Selenit durch die intestinale Bürstensaummembran an aus dem Schweinedarm isolierten Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) untersucht. In einigen zusätzlichen Experimenten wurden zum Vergleich intestinale BSMV vom Schaf und von der Ratte verwendet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- Ein in die Vesikel gerichteter transmembranaler Na^+ -Gradient stimulierte die Selenataufnahme in die aus dem Jejunum und Ileum des Schweines isolierten BSMV. Dagegen zeigte sich in aus dem Duodenum isolierten BSMV keine entsprechende Na^+ -Gradienten-Abhängigkeit. Die Selenataufnahme in jejunale BSMV vom Schaf bzw. in ileale BSMV von der Ratte wurde ebenfalls durch einen Na^+ -Gradienten stimuliert.
- Die Selenitaufnahme zeigte weder in den verschiedenen Dünndarmschnitten des Schweines noch im Jejunum des Schafes bzw. im Ileum der Ratte eine Na^+ -Gradienten-Abhängigkeit.
- Die Selenataufnahme in die Vesikel ist durch eine Aufnahme von Selenat ins Vesikellumen bedingt. Dagegen erwies sich die "Selenitaufnahme" ausschliesslich als Bindung an die Membran.

- Thiosulfat in einer 250-fachen Konzentration von Selenat hemmte die vom Na^+ -Gradienten abhängige Selenataufnahme in jejunale BSMV vom Schwein vollständig. Ebenso liess sich die vom Na^+ -Gradienten abhängige Sulfataufnahme durch Selenat vollständig hemmen.
- Eine transmembranale Potentialdifferenz zeigte keinen Einfluss auf die vom Na^+ -Gradienten abhängige Selenataufnahme in BSMV aus dem Jejunum des Schweines. Dagegen stimulierte eine transmembranale Potentialdifferenz mit positiver Membraninnenseite die Na^+ -unabhängige Selenataufnahme.

Diese Resultate zeigen, dass im Jejunum und Ileum des Schweines, im Jejunum des Schafes und im Ileum der Ratte der Transport von Selenat durch die BSM durch einen Na^+ -Gradienten energetisiert wird. Bei dem betreffenden Transportmechanismus handelt es sich sehr wahrscheinlich um denselben Mechanismus, durch den die aktive Absorption von Sulfat erfolgt.

Die starke Bindung von Selenit an die BSMV könnte durch eine Reaktion von Selenit mit membranständigen SH-Gruppen bedingt sein. Dadurch dürfte die Absorption von Selenit beeinträchtigt werden.

SUMMARY

Uptake of selenate and selenite by isolated intestinal brush border membrane vesicles

Selenium (Se) is an essential trace element in human and animal nutrition. It is ingested mainly in the protein-bound form (seleno-amino acids) but also in part in the form of inorganic selenium salts. In low Se-areas, supplementation of feed with selenium salts has been successfully used to prevent Se deficiency disorders. However, knowledge about the absorptive mechanisms for selenate and selenite is limited.

The present work was performed to investigate transport of selenate and selenite into brush border membrane vesicles (BBMV) isolated from pig small intestine. Additionally, BBMV from sheep jejunum and rat ileum were used for comparison. The subsequent results were obtained:

- Selenate uptake into jejunal and ileal, but not into duodenal BBMV from pig was stimulated by an inwardly directed ($\text{Na}^+_{\text{out}} > \text{Na}^+_{\text{in}}$) transmembrane Na^+ -gradient. Selenate transport into rat ileal and sheep jejunal BBMV was also stimulated in the presence of a Na^+ -gradient.
- Selenite uptake was not Na^+ -dependent, neither in BBMV from pig small intestine nor from sheep jejunum and rat ileum.
- Uptake of selenate represented real uptake into the vesicular lumen, whereas "uptake" of selenite was due to binding of selenite to the membranes.
- Thiosulfat at a 250-fold concentration of selenate totally inhibited Na^+ -dependent selenate uptake into pig jejunal BBMV. Selenate also completely inhibited the uptake of sulfate.
- The Na^+ -dependent selenate uptake into pig jejunal BBMV was not influenced by a transmembrane electrical potential difference (PD) whereas Na^+ -independent selenate uptake was stimulated in the presence of an inside positive PD.

These results demonstrate that the transport of selenate across the BBM of pig jejunum and ileum and also of sheep jejunum and rat ileum is energized by a transmembrane Na^+ -gradient.

Further the results strongly suggest, that there exists a common transport mechanism for active sulfate and selenate absorption in the BBM.

The extensive binding of selenite to the BBM might be due to a reaction between selenite and SH-groups of the membrane proteins.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) AHEARN G.A., H.MURER (1984)
Functional roles of Na^+ and H^+ in SO_4^{2-} -transport by rabbit ileal brush border membrane vesicles
J. of Membrane Biol. 78, 177-186
- (2) ÅKESSON B., P.Å.ÖCKERMAN (1985)
Selenium status in vegans and lactovegetarians
British Journal of Nutrition 53, 199-205
- (3) ANDREESEN J.R.; L.G.LJUNGDAHL (1973)
Formate dehydrogenase of clostridium thermoaceticum:
Incorporation of selenium-75 and the effects of selenite, molybdate and tungstate on the enzyme
J.Bacteriol. 116, 867
- (4) ARDUESER F., S.WOLFFRAM, E.SCHARRER (1985)
Active absorption of selenate by rat ileum
J.Nutr. 115, 1203-1208
- (5) ARDUESER F., S.WOLFFRAM, E.SCHARRER, B.SCHNEIDER
Transport of selenate and selenite across the brush border membrane of rat and sheep small intestine
Biol.Trace Element Research (im Druck)
- (6) BOPP A.B., R.C.SONDERS, J.W.KESTERSON (1982)
Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man
Drug Metabolism Reviews 13, 271-318
- (7) CANTOR A.H., P.D.MOORHEAD, M.A.MUSSER (1981)
Biological availability of selenium compounds and feed ingredients
in: Selenium in Biology & Medicine, 192-202
edited by J.E.Spallholz, J.L.Martin, H.E.Ganther. AVI Publishing Company, INC. Westport, Connecticut
- (8) CANTOR A.H., J.Z.TARINO (1982)
Comparative effects of inorganic and organic dietary sources of selenium on selenium levels and selenium-dependent glutathione peroxidase activity in blood of young turkeys
J.Nutr. 112, 2187-2198
- (9) CARDIN C.J., J.MASON (1975)
Sulfate transport by rat ileum
Biochim.Biophys.Acta 394, 46-54

- (10) CHRISTIANSEN K., J.CARLSEN (1981)
Microvillus membrane vesicles from pig small intestine
Purity and lipid composition
Biochim.Biophys.Acta 647, 188-195
- (11) COMBS G.F., COMBS S.B. (1984)
The nutritional biochemistry of selenium
Ann.Rev.Nutr. 4, 257-280
- (12) DOWNES C.P., Ch.A.McAUCLIFFE, M.R.C.WINTER (1979)
Selenium in biochemistry
Inorganic Perspectives in Biology and Medicine 2, 241-270
- (13) EGER S., D.DRORI, I.KADOORI, N.MILLER, H.SCHINDLER (1985)
Effects of selenium and vitamin E on incidence of
retained placenta
J.Dairy Sci. 68, 2119-2122
- (14) FISCHER L.J., C.HOOGENDOORN, J.MONTEMURRO (1980)
The effect of added dietary selenium on the selenium
content of milk, urine and feces
Can.J.Anim.Sci. 60, 79-86
- (15) FLOHE L., W.A.GARDINER, H.H.SCHOCK (1973)
Gluthathione peroxidase: a selenoenzyme
FEBS Lett. 32, 132-134
- (16) FRANKE K.W. (1934)
A new toxicant occurring naturally in certain samples
of plant foodstuffs. I: Results obtained in preliminary
feeding trials
J.Nutr. 8, 597-608
- (17) FUSS Ch.N., K.O.GODWIN (1975)
A comparison of the uptake of (⁷⁵Se)selenite, (⁷⁵Se)seleno-
methionine and (³⁵S)methionine by tissues of ewes and
lambs
Aust.J.Biol.Sci., 28, 239-249
- (18) GANTHER H.E., C.A.BAUMANN (1962)
Selenium metabolism.II.Modifying effects of sulfate
J.Nutr. 77, 408-414
- (19) GOEHRING T.B., I.S.PALMER, O.E.OLSON, G.W.LIBAL and R.C.
WAHLSTROM (1984)
Effects of seleniferous grains and inorganic selenium
on tissue and blood composition and growth performance
of rats and swine
J. Anim.Sci. 59, 725-732
- (20) HANIMANN R., M.WALLIMANN (1983)
Zur Selen- und Vitamin E-Versorgung des Schweines.
Beziehung zur Maulbeerherzkrankheit
Inaugural-Dissertation, Vet.Med.Fakultät, Universität Zürich

- (21) HARR J.R., J.F.BONE, I.J.TINSLEY, P.H.WESWIG, R.S.YAMAMOTO (1967)
Selenium toxicity in rats.II. Histopathology
Selenium in Biomedicine,ed.O.Muth.
AVI Publishing Co.,Inc.,Westport, Conn., 153-178
- (22) HIDIROGLOU M., D.P.HEANEY, K.J.JEMKINS (1968)
Metabolism of inorganic selenium in rumen bacteria
Can.J.Physiol.Pharm. 46, 229-232
- (23) HIDIROGLOU M., K.J.JENKINS, J.E.KNIPFEL (1974)
Metabolism of selenomethionine in the rumen
Can.J.Anim.Sci. 54, 325-330
- (24) HILL C.H: (1975)
Interrelationship of selenium with other trace elements
Federation Proceedings 34,11,2096-2100
- (25) HOEKSTRA W.G. (1975)
Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E
Fed.Proc. 34, 2083-2089
- (26) HOGUE D.E. (1958)
Selenium and muscular dystrophy
J.Amer.Vet.Med.Ass. 133, 568
- (27) HOPFER U. (1977)
Isolated membrane vesicles as tools for analysis of epithelial transport
Am.J.Physiol. 233 , 445-449
- (28) JENKINS K.J., M.HIDIROGLOU (1971)
Transmission of selenium as selenite and selenomethionine from ewe to lambs via milk using selenium-75
Can.J.Anim.Sci. 51, 389-403
- (29) KESSLER M., O.ACUTO, C.STORELLI, H.MURER, M.MUELLER, G.SEMENZA (1978)
A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes.
Their use in investigating some properties of D-Glucose and choline transport systems
Biochim.Biophys.Acta, 506, 136-154
- (30) LONGRIDGE-SMITH J.E., J.H.SELLIN, M.FIELD (1983)
Sulfate influx across the rabbit ileal brush border membrane: sodium and proton dependence, and substrate specificities
J.Membrane Biol. 72, 131-139

- (31) LAWRENCE R.A., R.F.BURK (1976)
Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver
Biochem.Biophys.Res.Com. 71, 952-957
- (32) LEVANDER O.A. (1976)
Selected aspects of the comparative metabolism and biochemistry of selenium and sulfur
in: Trace elements in human health and disease.ed.: Prasad A.S. and Oberleas.Academic Press, New York, Vol.I and II, 135-163
- (33) LITTLE C., P.J.O'BRIEN (1968)
An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxidase substrate
Biochem.Biophys.Res.Com. 31, 145-150
- (34) LO M.T., SANDI E. (1980)
Selenium: occurrence in foods and its toxicological significance - a review
J.Environ-Pathol.Toxicol. 4, 193-218
- (35) LUECKE H., G.STAUGE, H.MURER (1981)
Sulfate-sodium cotransport by brush border membrane vesicles isolated from rat ileum
Gastroenterology, 80, 22-30
- (36) LUO X., H.WEI, C.YANG, J.XING, C.QIAD, Y.FENG, J.LIU, Z.LIU, Q.WU, Y.LIU, B.STOECKER, J.E.SPALLHOLZ, S.P.YANG (1985)
Selenium intake and metabolic balance of 10 men from a low selenium area of China
Am.J.Clin.Nutr. 42, 31-37
- (37) LUO X., H.WEI, CH.YANG, J.XING, X.LIU, CH.QIAD, Y.FENG, J.LIU, Y.LIU, Q.WU, X.LIU, J.GUO, B.J.STOECKER, J.E.SPALLHOLZ S.P.YANG (1985)
Bioavailability of selenium to residents in a low-selenium area of China
Am.J.Clin.Nutr. 42, 439-448
- (38) MARTIN J.L., M.L.GERLACHER (1972)
Selenium metabolism in animals
Ann.N.Y.Acad.Sci. 192, 193-199
- (39) McCONNELL K.P.m G.J.CHO (1967)
Active transport of selenomethionine in the intestine
Am.J.Physiol. 213, 150-156
- (40) MOE A.J., P.A.POCIUS, C.E.POLAN (1985)
Isolation and characterization of brush border membrane vesicles from bovine small intestine
J.Nutr. 115, 1173-1179

- (41) MURER H., U.HOPFER (1974)
Demonstration of electrogenic Na^+ -dependent D-Glucose transport in intestinal brush border membranes
Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 71(2), 484-488
- (42) MUTH O.H., J.E.OLDFIELD, L.F.REMMERT, J.R.SCHUBERT (1958)
Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease
Science 128, 1090
- (43) MUTH O.H., J.R.SCHUBERT, J.E.OLDFIELD (1961)
White muscle disease (myopathy) in lambs and calves.VII.
Etiology and prophylaxis
Am.J.Vet.Med.Res. 22, 466-467
- (44) NELSON A.A., O.G.FITZHUGH, H.O.CALVERY (1943)
Liver tumors following cirrhosis caused by selenium in rats
Cancer research 3, 230-236
- (45) PATTERSON E.L., R.MILSTREY, E.L.R.STOCKSTAD (1957)
Effect of selenium in preventing exsudative diathesis in chicks
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 95, 617-620
- (46) PETERSON P.J., D.J.SPEEDING (1963)
The excretion by sheep of selenium incorporated into red clover
N.Z.J.Agr.Res. 6, 13-23
- (47) RAAB W., E.SCHARRER (1980)
Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase der Dünndarmmucosa bei fettreicher Ernährung
Z.Ernährungswiss. 19, 276-279
- (48) ROTRUCK J.T., A.L.POPE, H.E.GANTHER, A.B.SWANSON, D.G.HAFEMANN W.G.HOECKSTRA (1973)
Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase
Science 179, 588-599
- (49) SACHS L. (1984)
Angewandte Statistik
Springer Verlag Berlin Heidelberg NewYork Tokyo
6.Auflage
- (50) SCHRAUZER G.N. (1984)
Selenium in nutritional cancer prophylaxis: an update in: Vitamins, Nutrition and Cancer. ed.:Prasad
240-250. Karger, Basel

- (51) SCHWARTZ K., C.M.FOLTZ (1957)
Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary
necrotic liver degeneration
J.Amer.Chem.Soc. 79, 3292-3293
- (52) SHRIFT A. (1961)
Biochemical interactions between selenium and sulfur
in plants and microorganisms
Fed.Proc. 20, 695-702
- (53) TINSLEY I.J., J.R.HARR, J.F.BONE, P.H.WESWIG, R.S.YAMAMOTO
(1967)
Selenium toxicity in rats.I.Growth and longevity
in: Selenium in Biomedicine, ed.O.H.Muth
AVI Publishing Co., Inc.,Westport,Conn. pp 141-152
- (54) TURNER D.C., T.C.STADTMAN (1973)
Purification of protein components of clostridial
glycine reductase system and characterization of protein
A as selenoprotein
Arch.Biochem.Biophys. 154, 366
- (55) TUVE T., H.H.WILLIAMS (1961)
Metabolism of selenium by escherichia coli:
Biosynthesis of selenomethionine
J.Biol.Chem. 236, 597-601
- (56) ULLREY D.E. (1981)
Selenium in the soil-plant-food chain
in: Selenium in Biology & Medicine. Ed.:Spallholz J.E.,
J.L.Martin, H.E.Ganther. AVI Publishing Co.,Inc.Westport
Conn.,176-191
- (57) UNDERWOOD E.J. (1977)
Trace elements in human and animal nutrition
Academic Press Inc., fourth edition
- (58) VAN VLEET J.F. (1980)
Current knowledge of selenium-Vitamin E deficiency in
domestic animals
J.Am.Vet.Med.Assoc. 176, 321-325
- (59) WHANGER P.D., N.D.PEDERSON, J.HATFIELD, P.H.WESWIG (1976)
Absorption of selenite and selenomethionine from ligated
digestive segments in rats
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 153, 295-297
- (60) WHITE C.L. (1980)
Sulfur-selenium studies in sheep.II.Effect of a dietary
sulfur deficiency on selenium and sulfur metabolism in
sheep fed varying levels of selenomethionine
Austr.J.Biol.Sci., 33, 699-707

LEBENS LAUF

- 14.7.60 geboren in Zürich als 2.Tochter des Emil Frei,
Verkaufstechniker, und der Irma Frei, geb.Schwer.
Bürgerin von Gondiswil /BE
- 1967 - 1973 Primarschule in Dietikon /ZH
- 1973 - 1979 Gymnasium Töcherschule Hohe Promenade, Zürich
- 1979 Herbst, Matura Typus B
- 1979 - 1984 Studium der Veterinärmedizin an der Universität
Zürich
- 1984 Herbst, Staatsexamen als Tierärztin
- 1985 Mai, Heirat mit Ruedi Anliker, Geschäftsführer
- 1985 seit März, Doktorandin am Institut für Veterinär-
physiologie der Universität Zürich

